

CAMILA ANDREIA BERNARDI

***Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi.  
COMO ALTERNATIVA DE ANTIINFLAMATÓRIO TÓPICO  
PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS DA PELE: UM ESTUDO  
PRÉ-CLÍNICO**

CURITIBA  
2009

CAMILA ANDREIA BERNARDI

***Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi.  
como alternativa de antiinflamatório tópico para o  
tratamento de doenças da pele: um estudo pré-clínico**

Dissertação desenvolvida no Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná durante o Curso de Pós-graduação em Farmacologia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Almeida Cabrini**

CURITIBA

2009

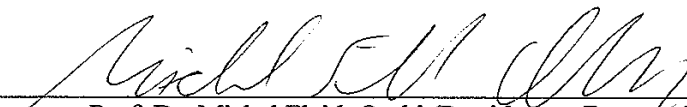


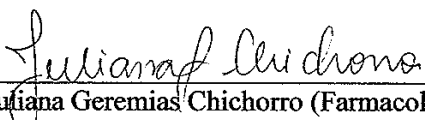
Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

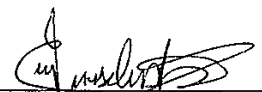


## PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "*Garcinia gardneriana* (PLANCHON & TRIANA) ZAPPI. ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS DA PELE: UM ESTUDO PRÉ-CLÍNICO.", de autoria da pós-graduanda: **CÂMILA ANDRÉIA BERNARDI**, sob orientação do Prof. Dr. Michel Fleith Otuki e composta pelos professores: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Presidente - Farmacologia - UFPR); Profª. Drª. Juliana Geremias Chichorro (Farmacologia - UFPR); Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (Farmacologia - UFSC). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por seu orientador. Em Curitiba, 30 de setembro de 2009.

  
Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Presidente - Farmacologia - UFPR)

  
Profª. Drª. Juliana Geremias Chichorro (Farmacologia - UFPR)

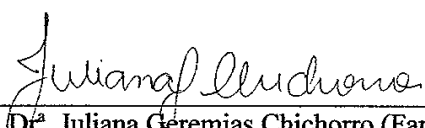
  
Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (Farmacologia - UFSC)

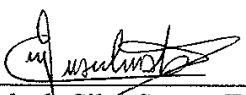


**ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Ao trigésimo dia do mês de setembro do ano de dois mil e nove, às nove horas, no Anfiteatro nº 5 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de autoria da Pós-Graduanda em Farmacologia, **CAMILA ANDRÉIA BERNARDI**, intitulada: "*Garcinia gardneriana* (PLANCHON & TRIANA) ZAPPI. ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS DA PELE: UM ESTUDO PRÉ-CLÍNICO.", sob orientação do Prof. Dr. Michel Fleith Otuki e composta pelos professores: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Presidente - Farmacologia - UFPR); Profª. Drª. Juliana Geremias Chichorro (Farmacologia - UFPR); Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (Farmacologia - UFSC). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. A candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida argüida durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: aprovada. De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a Pós-Graduanda foi aprovada. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por seu orientador. Nada mais havendo a tratar, o Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pelo Presidente e pelos demais membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 30 de setembro de 2009.

  
Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Presidente - Farmacologia - UFPR)

  
Profª. Drª. Juliana Geremias Chichorro (Farmacologia - UFPR)

  
Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (Farmacologia - UFSC)

*Não se acostume com o que não o faz feliz,  
revolte-se quando julgar necessário.  
Alague seu coração de esperanças,  
mas não deixe que ele se afogue nelas.  
Se achar que precisa voltar, volte!  
Se perceber que precisa seguir, siga!  
Se estiver tudo errado, comece novamente.  
Se estiver tudo certo, continue.  
Se sentir saudades, mate-a.  
Se perder um amor, não se perca!  
Se o achar, segure-o!”*

*Fernando Pessoa*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças quando pensava que não mais as tinha, não me deixando vencer pelo cansaço e desânimo, e assim me guiar para alcançar esta conquista, sempre iluminando meu caminho e tornando-o menos sinuoso. Ele também me deu uma família e um amor maravilhosos, aos quais devo muito.

Meus pais são pessoas admiráveis que sempre me apoiaram, me deram muito amor, carinho e força, perdoaram meus erros e ensinaram muitas coisas, mas principalmente me deram o maior exemplo de dignidade e consciência que eu poderia ter. Só estou aqui, porque vocês me guiaram. Gostaria que vocês soubessem que lhes sou eternamente grata e o quanto significam para mim, impossível relatar em palavras. Eu os amo muito!

Ao meu grande amor, que sempre confiou em mim, acreditou que eu sou capaz de alcançar meus sonhos e também é responsável pelas minhas principais conquistas. Você é muito especial!

Aos meus amigos, são muitos, mas não poderia deixar de agradecer aqueles que sempre me ajudaram, me protegendo e tomando conta de todo trabalho para que eu pudesse alcançar esta conquista: Silene, Sandro e Lu, meus grandes e verdadeiros amigos.

Aos colegas de laboratório, por todo apoio, ajuda e ensinamentos, com certeza devo muito a vocês. Dai obrigada por tudo, é muito bom ter uma amiga como você.

Michel e Dani, não sei o que poderia escrever para demonstrar o quanto os respeito e admiro, gostaria muito de agradecê-los pela paciência, incentivo e por tudo que me ensinaram. Agradeço a Deus por ter colocado no meu caminho pessoas como vocês. Estarei sempre torcendo por vocês e os admirando, mesmo de longe.

Enfim, tenho muito a agradecer, porque graças a Deus tenho muitas pessoas ao meu redor torcendo por mim, e é o amor e a torcida destas pessoas que fazem esta conquista valer a pena.

## RESUMO

A *Garcinia gardneriana* (Cluseacea) é uma planta nativa do interior da Mata Atlântica, facilmente encontrada na beira de rios e córregos. É conhecida popularmente como “bacupari”, “bacopari”, “bacupari miúdo” ou “mangostão amarelo”, sendo utilizada na medicina tradicional para infecções, dor e diversos tipos de inflamação. Em sua composição fitoquímica estão presentes as xantonas, esteróides, triterpenos e biflavonóides, os quais já demonstraram atividade antiinflamatória em estudos prévios. O presente estudo teve por objetivo a avaliação da atividade antiinflamatória tópica do extrato hidroalcolólico da *Garcinia gardneriana* (EHGG) bem como dos biflavonóides fukugetin e GB-2a sobre processos inflamatórios cutâneos agudos. Para tal, foi realizado modelo de edema de orelha em camundongos (Swiss fêmeas, pesando entre 25 a 30 g) induzido pela aplicação tópica do óleo de cróton, ácido araquidônico (AA), capsaicina ou fenol. Primeiramente, os EHGG das folhas, casca ou sementes foram avaliados no edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton. O extrato das folhas foi capaz de reduzir o edema ( $70 \pm 3$  % de inibição na dose 0,3 mg/orelha e  $DI_{50}$  0,033 mg/orelha), enquanto os extratos das sementes ( $51 \pm 5$  % de inibição) e da casca ( $60 \pm 12$  % de inibição) mostraram-se menos efetivos nas doses de 0,1 e 1 mg/orelha, respectivamente. Na avaliação tempo-resposta, o EHGG das folhas (1 mg/orelha) foi significativamente eficaz quando aplicado 2 h antes até 3 h após a indução do edema com óleo de cróton, apresentando maior eficácia quando aplicado junto ao agente flogístico ( $83 \pm 7$  % de inibição). A infiltração de neutrófilos, avaliada através da atividade da mieloperoxidase (MPO), também foi reduzida pela aplicação tópica do EHGG das folhas em  $64 \pm 13$  %, confirmado através de análise histológica. Resultados similares foram observados com fukugetin e GB-2a, os quais foram capazes de reduzir significativamente o edema de orelha do óleo de cróton com  $DI_{50}$  de 0,18 (0,10–0,28) e 0,22 (0,15–0,31) mg/orelha e com inibição de  $71 \pm 4$  % e  $58 \pm 6$  %, respectivamente, na dose de 0,3 mg/orelha. Além disso, a aplicação tópica do fukugetin (0,1 mg/orelha) e do GB-2a (0,3 mg/orelha) inibiu a atividade da MPO em  $52 \pm 6$  % e  $64 \pm 5$  %, respectivamente. O EHGG das folhas e os 2 biflavonóides, fukugetin e GB-2a, foram capazes de reduzir consideravelmente a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) na pele causada pela aplicação do óleo de cróton, com inibição de  $52 \pm 15$  %,  $63 \pm 17$  % e  $83 \pm 4$  %, respectivamente. No ensaio de DPPH (2, 2-difenil-1-picrihidrazil), o EHGG e os dois compostos reduziram a formação de radicais livres de modo dependente da concentração. O EHGG das folhas, aplicado topicamente, foi capaz de alterar a formação do edema em outros modelos de inflamação cutânea aguda. O edema de orelha causado pelo AA foi reduzido  $57 \pm 10$  % (0,03 mg/orelha) e o causado pelo fenol em  $81 \pm 6$  % (1 mg/orelha) pelo tratamento com EHGG. No entanto o extrato não interferiu no edema induzido pela capsaicina. Portanto, o presente trabalho demonstra a eficácia da *G. gardneriana*, principalmente das folhas, e justifica seu uso popular em processos inflamatórios cutâneos. Além disso, a eficácia antiinflamatória tópica da *G. gardneriana* pode envolver a redução de mediadores inflamatórios causadores de edema e migração leucocitária e seqüestrando radicais livres, podendo introduzir esta como uma planta de significativo interesse para o desenvolvimento de um novo antiinflamatório tópico.

**Palavras-chave:** *Garcinia gardneriana*, fukugetin, GB-2a, edema de orelha, antiinflamatório tópico.

## ABSTRACT

The *Garcinia gardneriana* (Cluseacea) is a native plant from the Atlantic Forest, easily found on the banks of rivers and streams. It is popularly known as "bacupari", "bacopari", "bacupari miúdo" or "mangostão amarelo", being used in traditional medicine for infections, pain and various types of inflammation. Its phytochemical composition show the presence of xanthonenes, steroids, triterpenes and biflavonoids. In a previous study, the hydroalcoholic extract of *G. gardneriana* (HEGG) have shown anti-inflammatory activity. This study aimed to evaluate the topical anti-inflammatory activity of the HEGG, and of both biflavonoids fukugetin and GB-2a on cutaneous acute inflammation. The ear oedema in mice (Swiss females, 25 to 30 g) was induced by topical application of croton oil, arachidonic acid (AA), capsaicin or phenol. The HEGG from leaves, bark and seeds were evaluated against croton oil ear oedema. Leaves extract was able to reduce the ear oedema ( $70 \pm 3$  % inhibition in dose 0,3 mg/ear and  $ID_{50}$  0,033 mg/ear), while seeds ( $51 \pm 5$  %) and bark ( $60 \pm 12$  %) were less effective. In a time-course evaluation, the leaves extract (1 mg/ear) was significantly effective when mice were treated from 2 h before until 3 h after the croton oil challenge, presenting a maximal inhibition when the extract was applied at the same time as croton oil ( $83 \pm 7$  %). In addition, the neutrophils infiltration caused by croton oil, evaluated by myeloperoxidase (MPO) activity, also was inhibited in  $64 \pm 13$  %, which was confirmed by histological analysis. Similar results were observed with the biflavonoids fukugetin and GB2a, that significantly reduced the ear oedema, with  $ID_{50}$  of 0,18 (0,10–0,28) and 0,22 (0,15–0,31) mg/ear and  $71 \pm 4$  % and  $58 \pm 6$  % inhibition (0,3 mg/ear), respectively. Application of the fukugetin or GB-2a to the ear caused inhibition of MPO activity, with inhibition of  $52 \pm 6$  % (0,1 mg/ear) and  $64 \pm 5$  % (0,3 mg/ear), respectively. Besides, the leaves HEGG, and fukugetin and GB2a, were able to considerably reduce the production of reactive oxygen species induced by croton oil in the skin, with  $52 \pm 15$  %,  $63 \pm 17$  and  $83 \pm 4$  % inhibition, respectively. Again, the HEGG and both compounds showed an *in vitro* scavenger activity that was concentration-dependent. The topical application of HEGG also resulted in reduction of ear oedema caused by AA with  $57 \pm 10$  % inhibition (0,03 mg / ear), and by phenol with  $81 \pm 6$  % reduction (1 mg/ear). But the HEGG was unable to interfere with the swelling caused by topical capsaicin. Therefore, the present study show the efficacy of *G. gardneriana*, specially of leaves, and justified its popular use for skin inflammatory processes. Besides, the topical anti-inflammatory activity of *G. gardneriana* may involves the reduction of inflammatory mediators and the scavenger of free radicals, suggesting this as a new option for a topical anti-inflammatory drug.

**Key words:** *Garcinia gardneriana*, fukugetin, GB-2a, ear edema, topical anti-inflammatory



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURA .....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1 Fisiologia da pele .....	02
1.2 Inflamação cutânea.....	08
1.3 <i>Garcinia gardneriana</i> (Planchon & Triana) Zappi.....	14
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
3.1 Animais e manutenção .....	22
3.2 Classificação botânica .....	22
3.3 Coleta, extração e preparo do material vegetal .....	22
3.4 Isolamento e purificação dos compostos .....	23
3.5 Avaliação do edema de orelha .....	23
3.5.1 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton.....	24
3.5.2 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico ..	24
3.5.3 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina .....	24
3.5.4 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de fenol.....	25
3.6 Medida da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) .....	25
3.7 Análise histológica .....	26
3.8 Determinação de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	26
3.9 Estudo <i>in vitro</i> da atividade sequestradora de radicais livres (DPPH) .....	27
3.10 Análise estatística.....	27
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
4.1 Efeito do EHGG no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton.	29
4.2 Avaliação tempo-resposta do EHGG das folhas no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	31
4.3 Efeito do EHGG sobre a atividade da enzima MPO .....	32
4.4 Efeito tópico dos biflavonóides da <i>Garcinia gardneriana</i> no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	33
4.5 Efeito tópico dos biflavonóides da <i>Garcinia gardneriana</i> na atividade da enzima MPO .....	35
4.6 Análise histológica .....	37
4.7 Efeito antioxidante do EHGG das folhas e dos biflavonóides fukugetin e GB-2a .....	38
4.8 Avaliação da atividade sequestradora de radicais livres do EHGG <i>in vitro</i> .....	39
4.9 Efeito do EHGG das folhas no modelo de edema de orelha induzido por AA .	41
4.10 Efeito do EHGG das folhas no modelo de edema de orelha induzido por capsaicina.....	42
4.11 Efeito do EHGG das folhas no modelo de edema de orelha induzido por fenol .....	43

<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>57</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema simplificado das camadas da pele .....	02
FIGURA 2: Esquema simplificado de uma secção transversal da epiderme.....	04
FIGURA 3: Partes aéreas da <i>Garcinia gardneriana</i> (Pl. & Tr.) Zappi .....	16
FIGURA 4: Representação da estrutura química dos biflavonóides da <i>Garcinia gardneriana</i> .....	18
FIGURA 5: Curva dose-resposta do EHGG no edema de orelha induzido por óleo de cróton .....	30
FIGURA 6: Curva tempo-resposta do EHGG das folhas no edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	31
FIGURA 7: Efeito do EHGG das folhas sobre o aumento na atividade da MPO induzida pelo óleo de cróton .....	32
FIGURA 8: Efeito do biflavonóides fukugetin e GB-2a sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton .....	34
FIGURA 9: Efeito dos biflavonóides fukugetin e GB-2a sobre o aumento na atividade da MPO induzida pelo óleo de cróton .....	36
FIGURA 10: Análise histológica do efeito do EHGG das folhas sobre o infiltrado leucocitário no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton.	37
FIGURA 11: Efeito antioxidante do EHGG das folhas e dos biflavonóides fukugetin e GB-2a em modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton ....	38
FIGURA 12: Efeito antioxidante do EHGG das folhas e dos biflavonóides fukugetin e GB-2a sobre o DPPH, <i>in vitro</i> .....	40
FIGURA 13: Curva dose-resposta do EHGG das folhas no edema de orelha induzido por ácido araquidônico.....	41
FIGURA 14: Curva dose-resposta do EHGG das folhas no edema de orelha induzido por capsaicina.....	42
FIGURA 15: Curva dose-resposta do EHGG das folhas no edema de orelha induzido por fenol.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido Araquidônico  
AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida  
AP-1 – Proteína ativadora-1  
COX-1 – Cicloxigenase 1  
COX-2 – Cicloxigenase 2  
DCFH - 2',7'-diclorofluoresceína  
DCFH-DA – 2',7'-diclorofluoresceína diacetato  
Dexa – Dexametasona  
DI50 – Dose inibitória 50%  
DPPH – 2, 2-difenil -1 - picrihidrazil  
EHGG – Extrato hidroalcolico da *Garcinia gardneriana*  
ERO – Espécies reativas de oxigênio  
FDA – Food and Drug Administration  
GB-2a – I3-naringenina-II8-eridictiol  
GB-2a-II-4'-OMe - I3-naringenina-II8-4'-Ome-eridictiol  
GPX – Glutathione peroxidase  
GR – Glutathione reductase  
GSH – Glutathione reduzida  
HTBA – Hexadeciltrimetilamônia  
ICAM – Molécula de adesão intercelular  
IgE – Imunoglobulina E  
IgG – Imunoglobulina G  
IFN- $\gamma$  – Interferon gama  
IL – Interleucina  
Imax – Inibição máxima  
iNOS – Óxido Nítrico Sintase induzida  
JDE – Junção dermoepidérmica  
LOX – Lipoxigenase  
5-LOX – 5-lipoxigenase

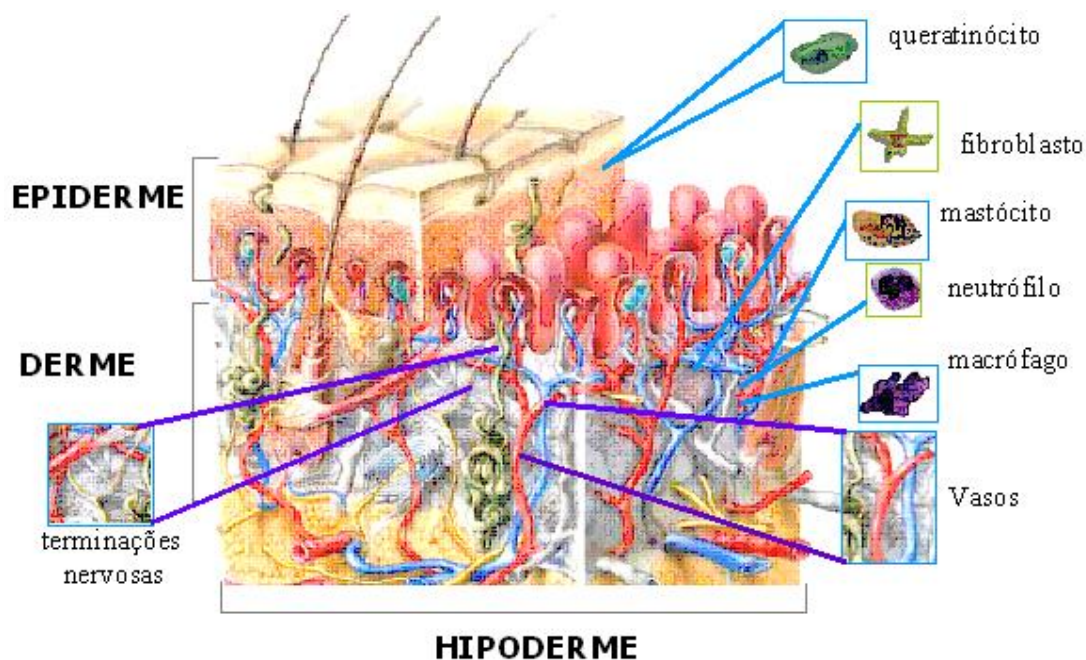
LT - Leucotrieno  
MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno  
mDO – mili-Densidade Óptica  
MPO – mieloperoxidase  
NF-kB – Fator de Transcrição Nuclear- Kappa B  
NO – Óxido Nítrico  
NOS – Óxido Nítrico Sintetase  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PBS – Tampão fosfato de sódio  
PAF – Fator de agregação plaquetária  
PG - Prostaglandina  
PGE2 – Prostaglandina E2  
PK - Proteína quinase  
PKA – Proteína quinase A  
PKC – Proteína quinase C  
PLA2 – Fosfolipase A2  
PMN – Polimorfonucleares  
SOD – Superóxido dismutase  
Th – T helper  
TGF  $\beta$ 1 – Fator de crescimento tumoral  $\beta$ 1  
TMB - Tetrametilbenzidina  
TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
TPA – 12-O-tetradecanoilforbol acetato  
TX - Tromboxano  
UV – Ultravioleta



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Fisiologia da Pele

A pele é formada por tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica que se arranjam em três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1) (KEDE e SABATOVICH, 2004), dispostas e inter-relacionadas para adequar-se de maneira harmônica ao desempenho de suas funções (CHUONG *et al.*, 2002; HAAKE *et al.*, 2000; SHAEFER e REDELMEIER, 1996; ROSS *et al.*, 1993; SAMPAIO *et al.*, 2000).



**Figura 1:** Esquema simplificado das camadas da pele.

**Fonte:** adaptado de Freinkeil e Woodley, 2001.

A interação coordenada das células presentes nas diferentes camadas da pele a possibilita desenvolver a função de proteção, uma vez que a torna capaz de responder a estímulos nocivos que ocorrem na interface do organismo com o meio externo (BURBACH *et al.*, 2000; HAAKE *et al.*, 2000; WILLIAMS e KUPPER, 1996). A pele também age como órgão sensorial, participa do sistema imunológico e exerce outras funções, como produção de vitamina D3, excreção de eletrólitos e outras substâncias e

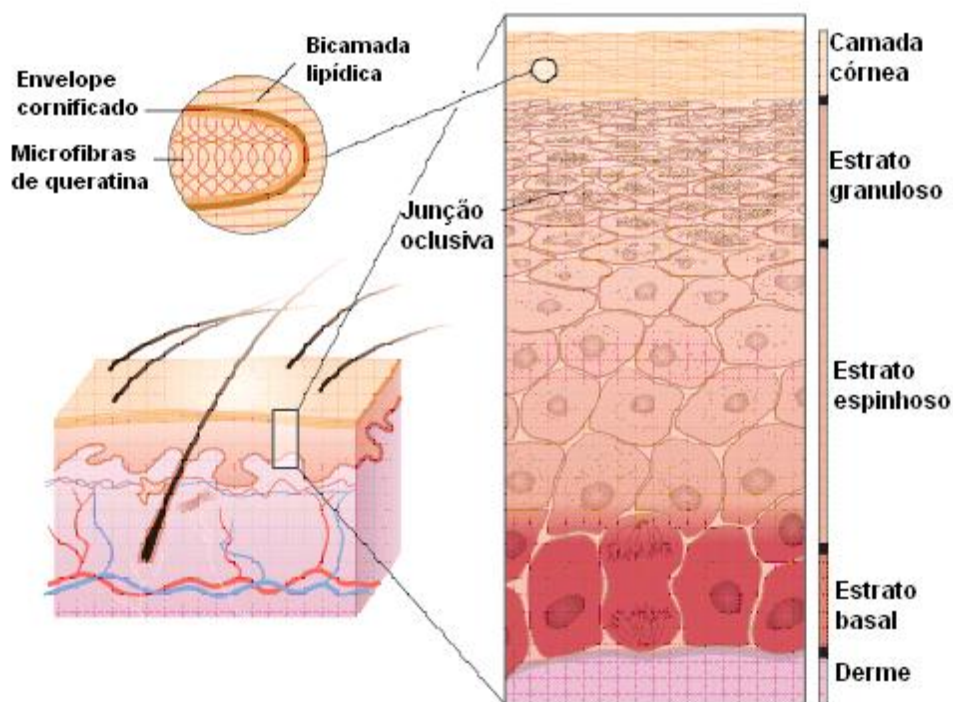
confere uma proteção relativa contra insultos físicos. Embora a pele represente menos de 15% do peso do corpo, ela é considerada o maior órgão humano, pois a sua extensão corresponde a uma área de dois metros quadrados (KEDE e SABATOVICH, 2004).

A camada superior da pele é a epiderme (SAMPAIO *et al.*, 2000). De origem ectodérmica, é um epitélio de revestimento estratificado e pavimentoso por possuir várias camadas de células que vão se achatando à medida que se tornam mais superficiais. Como todo epitélio, as células da epiderme se renovam indefinidamente devido a uma atividade mitótica contínua. A principal função da epiderme é produzir queratina, uma proteína fibrosa maleável, responsável pela impermeabilidade cutânea, e as células que estão envolvidas nesta função são denominadas queratinócitos (KEDE e SABATOVICH, 2004).

A maioria das células da epiderme são queratinócitos. Estas células são organizadas em quatro camadas e são classificadas conforme sua posição ou conforme as propriedades estruturais das células nelas incluídas. As células viáveis se movem para fora da camada basal para formarem progressivamente camadas de células mais diferenciadas; sendo que os queratinócitos queratinizados são células completamente diferenciadas do estrato córneo (FITZPATRICK, 2005).

Na pele delgada, podem ser distinguidas quatro camadas na epiderme: a camada córnea, o estrato granuloso, o estrato espinhoso e o estrato basal, sendo esta a camada mais profunda (figura 2) (ROSS *et al.*, 1993), que repousa sobre a membrana basal e é caracterizada por proliferação celular (FUCHS e RAGHAVAN, 2002). As características de cada camada da epiderme refletem propriedades mitóticas e sintéticas de queratinócitos e seu estado de diferenciação (FITZPATRICK, 2005).





**Figura 2:** Esquema simplificado de uma seção transversal da epiderme.

**Fonte:** adaptado de Segre, 2006.

O balanço entre proliferação e morte celular dos queratinócitos, diferenciação e apoptose, respectivamente, é essencial para a manutenção do número de células na epiderme, uma vez que esta tem a capacidade de auto-renovação tanto sob condições homeostáticas como em condições nocivas, devido à presença de uma população celular mitoticamente ativa na camada basal (HAAKE *et al.*, 2000). A renovação epidérmica exibe uma diferenciação celular progressiva, através do processo de queratinização e cornificação, a partir da camada basal em direção a superfície (FUCHS e RAGHAVAN, 2002). A atividade mitótica da epiderme é restrita a uma ou duas fileiras de células situadas na base, na camada basal ou germinativa. As células resultantes da divisão celular são empurradas para as camadas mais superiores, sofrem modificações da estrutura pela diferenciação celular, com alterações morfológicas nesta progressão, vindo a constituir as camadas espinhosa, granulosa e córnea. Esta última camada acaba por descamar na superfície (KEDE e SABATOVICH,

2004). É importante enfatizar que a diferenciação envolve uma série de eventos controlados regulados por fatores extrínsecos e intrínsecos (sistêmicos e genéticos) e, portanto, é vulnerável a alterações em diferentes níveis do processo de queratinização (FITZPATRICK, 2005).

Embora aproximadamente 80-85% da epiderme seja constituída de queratinócitos, também estão presentes outros tipos celulares: 10-13 % de melanócitos, 4% de células de Langerhans e 1% de células de Merckel (KOSTER e ROOP, 2004).

Os melanócitos são células dendríticas, situados imediatamente abaixo da camada basal, na proporção de um melanócito para cada dez queratinócitos basais. Os melanócitos são responsáveis pela produção de melanina, pigmento de cor acastanhada que é transferido para os queratinócitos através dos processos dendríticos. Cada melanócito transfere melanina para 36 queratinócitos vizinhos, mas o pigmento é visto principalmente dentro das células basais (KEDE e SABATOVICH, 2004).

As células de Langerhans são células derivadas da medula óssea, processadoras e apresentadoras de antígeno envolvidas em diversas respostas de células T (FITZPATRICK, 2005). Situam-se esparsamente entre os queratinócitos espinhosos e, por estarem envolvidas com o sistema imunológico, expressam uma estrutura na membrana celular responsável pela apresentação de antígenos aos linfócitos que são encontrados próximos a elas nas dermatites de contato alérgicas. Exibem ainda receptores de membrana para a porção Fc das imunoglobulinas IgG e IgE e para o componente C3b do complemento (KEBE e SABATOVICH, 2004).

As células de Merkel são receptores mecânicos de baixa adaptação, localizados nos tecidos de grande sensibilidade tátil. São estimuladas conforme os queratinócitos são deformados e respondem à secreção de transmissores químicos. Fazem contatos sinápticos com terminações nervosas e parecem estar envolvidas em doenças de pele, principalmente neoplasias (FITZPATRICK, 2005).

A epiderme apresenta um arranjo que lhe confere grande adesão à derme e que fornece maior superfície de contato entre elas, permitindo uma troca eficaz entre estes dois componentes, pois a epiderme é avascular, e todos os nutrientes necessários à

sua proliferação e diferenciação derivam dos capilares dérmicos (KEDE e SABATOVICH, 2004).

A interface entre epiderme e derme é formada pela junção dermoepidérmica (JDE), uma zona de membrana basal, cuja maior função é ligar a epiderme à derme e fornecer resistência contra forças externas. Ela serve como um suporte para epiderme, determina a polaridade do crescimento, direciona a organização do citoesqueleto nas células basais, desencadeia sinais de desenvolvimento e serve como uma barreira semipenetrável. As estruturas da JED são quase que inteiramente produtos dos queratinócitos basais com poucas contribuições de fibroblastos da derme (FITZPATRICK, 2005).

A derme consiste em um tecido conectivo, que confere à pele elasticidade, força tensil e resistência mecânica. Apresenta uma população celular inferior à da epiderme, porém sua espessura é superior (HAAKE *et al.*, 2000) e variável ao longo do organismo (FREINKEL e WOODLEY, 2000). De origem mesodérmica, é subdividida em dois componentes: a porção papilar e a porção reticular. A derme é formada por fibras colágenas, fibras elásticas e substância amorfa, todas produzidas pelos fibroblastos. Na derme encontram-se vasos sanguíneos, nervos e músculos eretores do pêlo, além dos anexos cutâneos, folículos pilossebáceo-apócrinos e glândulas écrinas (KEDE e SABATOVICH, 2004).

Fibroblastos, macrófagos e mastócitos são células residentes regularmente na derme. Elas são encontradas em grande densidade na pele normal e na região papilar da derme, mas também ocorrem na derme reticular onde são encontradas nos interstícios entre os feixes de fibras de colágeno. Encontra-se ainda um pequeno número de linfócitos em torno dos vasos sanguíneos na pele normal, entretanto, nos sítios de inflamação linfócitos e outros leucócitos são proeminentes (FITZPATRICK, 2005).

Fibroblastos são células responsáveis pela síntese e degradação de proteínas e de vários fatores solúveis da matriz do tecido conjuntivo fibroso e não-fibroso. Portanto, a função do fibroblasto é proporcionar um ambiente estrutural da matriz extracelular assim como promover interações entre a epiderme e a derme através da síntese de mediadores solúveis. Além disso, os mesmos fibroblastos também são capazes de

sintetizar mais de um tipo de proteína simultaneamente (por exemplo, colágeno e elastina) (FREINKEL e WOODLEY, 2000). Já os macrófagos e monócitos constituem o sistema de células mononucleares fagocíticas da pele (FITZPATRICK, 2005).

Os vasos sanguíneos presentes na derme permitem a infiltração de células migratórias importantes para a resposta de defesa inata ou imune e para o processo de cicatrização, como os macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e outros (RYAN, 2004). As inervações vegetativas presentes na derme regulam glândulas sudoríparas, músculo pilo-erector e vasos sanguíneos, auxiliando no controle da temperatura corporal. Já a inervação sensitiva conduz estímulos mecânicos, térmicos, químicos e dolorosos para o sistema nervoso central (GOODWIN e WHEAT, 2004).

Por fim, a camada mais interna da pele, a hipoderme (KEDE e SABATOVICH, 2004). Esta atua como isolante, reduzindo o movimento de calor para dentro ou para fora do corpo, absorve a energia liberada em traumas mecânicos bruscos e participa ativamente do metabolismo energético em geral (FITZPATRICK, 2005).

Reconhecer a composição normal da pele em termos de estrutura e função é importante para identificar as variações e diagnosticar doenças da pele para que se possa realizar um tratamento adequado. Essas variações se manifestam primeiramente através da espessura, composição e densidade dos anexos cutâneos (FREINKEL e WOODLEY, 2000).

Os diferentes tipos celulares presentes nas camadas da pele interagem de maneira coordenada, permitindo, assim, que este órgão responda efetivamente a vários estímulos nocivos que ocorrem na interface do organismo com o meio externo, tais como a ação de toxinas, organismos patogênicos, radiação ultravioleta e extremos de temperatura, o que garante a manutenção da homeostasia cutânea (BURBACH, *et al.*, 2000; HAAKE *et al.*, 2000; WILLIAMS e KUPPER, 1996).

As estruturas anexas da pele, folículos pilosos e glândulas sebáceas, provocam o rompimento da camada córnea, no entanto, a resposta imune inata suprime as infecções nessas regiões através de vários elementos como os macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, bem como várias citocinas e quimiocinas. Além disso, receptores para agentes invasores como o CD14, receptores toll-like e receptores de manose, também são observados nas células epidérmicas. Acrescenta-se ainda que a

pele, além de ser um dos principais locais para a invasão de bactérias, fungos, parasitas e vírus, também é um importante local para a indução de tumores, sendo esses processos influenciados pela resposta imune adquirida, que inclui células dendríticas especializadas (ex.: células de Langerhans) e linfócitos T helper (Th1 e Th2) (NORRIS, 2004).

Diante desse contexto, a pele não se configura apenas como uma barreira física passiva entre o meio externo e interno, mas também como uma extensão do sistema imunológico (WILLIAMS e KUPPER, 1996).

## **1.2 Inflamação cutânea**

Por ser o maior órgão do corpo humano e, por ser a interface com o meio externo, a pele está constantemente sujeita a lesões e invasão de patógenos que podem gerar diversos processos inflamatórios. A resposta inflamatória cutânea é iniciada para promover a resolução de um desequilíbrio da homeostase da pele, por isso, juntamente com sinais inflamatórios (vasodilatação, aumento do fluxo sangüíneo, quimiotaxia, edema, entre outros) são gerados mecanismos para inibir este processo, como por exemplo, as lipoxinas que agem sobre os leucócitos inibindo a quimiotaxia, a adesão celular e sua transmigração através das células endoteliais, bem como o aumento da permeabilidade vascular mediado pelas células polimorfonucleares (PMN) (GILROY *et al.*, 2004). A falha destes mecanismos endógenos que controlam a inflamação pode fazer com que este processo, inicialmente resolutivo, desregule a homeostase do órgão, predispondo o mesmo a desenvolver processos inflamatórios crônicos (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001).

Alterações nos tecidos, provocadas por microorganismos, lesão tecidual e trauma levam à liberação de mediadores químicos endógenos e exógenos, que por sua vez, dão origem aos primeiros sinais cardinais da inflamação: rubor (vermelhidão), calor, edema (inchaço) e dor, descritos por Celso, no primeiro século (SERHAN *et al.*, 2008). A inflamação aguda é uma resposta rápida a estes microorganismos ou à lesão tecidual, que envolve recrutamento local e ativação de neutrófilos. A inflamação aguda apresenta três componentes principais que culminam nos 4 sinais cardinais da

inflamação: aumento do fluxo sanguíneo local, promovendo vermelhidão (rubor) e calor; extravasamento local de líquido plasmático rico em proteínas (conhecido como exsudato), resultando em inchaço dos tecidos inflamados (edema); recrutamento localizado e ativação de leucócitos circulantes, que são induzidos a migrar para os tecidos inflamados ou danificados, e estes leucócitos liberam mediadores que levam ao surgimento do quarto sinal cardinal da inflamação, a dor (POBER e SESSA, 2007).

A cascata de eventos desencadeada após uma agressão ou estímulo é consequência de uma interação complexa entre diferentes tipos celulares residentes no tecido cutâneo (queratinócitos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais, macrófagos) e vários mediadores pró-inflamatórios (NICKLOFF e NESTLÉ, 2004; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Durante o processo inflamatório, mediadores pró-inflamatórios são liberados tanto pelas células residentes do tecido cutâneo quanto pelas células transientes (neutrófilos, linfócitos, monócitos) e incluem os metabólitos do AA, histamina, serotonina, substância P, citocinas, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ERO), entre outros (SIMMONS, 2006; KUPPER, 1990 a).

Os queratinócitos são células produtoras de vários mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas, cuja produção está consideravelmente aumentada após a ativação dessas células por diferentes estímulos, e por isto constituem as células envolvidas na primeira linha de defesa do sistema imune cutâneo (WILLIAMS e KUPPER, 1996). Os queratinócitos armazenam grande quantidade de IL-1 em seu citoplasma, podendo liberá-la quando danificados, iniciando uma cascata inflamatória. Em resposta, queratinócitos vizinhos liberam mais IL-1 $\alpha$ , assim como IL-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral (TNF) -  $\alpha$  e IL-6, amplificando o sinal inicial. Concomitantemente, os queratinócitos produzem quimiocinas, incluindo IL-8 e fatores de crescimento, como IL-7 e IL-15, que facilitam sua sobrevivência e induzem à ativação de leucócitos em resposta às quimiocinas (SPELLBERG, 2000). Entretanto, entre todas as citocinas produzidas pelos queratinócitos, somente as primárias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) ativam um número suficiente de mecanismos efetores capazes de desencadear uma resposta inflamatória cutânea (KUPPER, 1990 b).

As citocinas consistem em mediadores protéicos com ações que envolvem o desenvolvimento da resposta imune celular e humoral, a indução da inflamação, o

controle da proliferação e diferenciação celular, bem como a indução da cicatrização. As respostas imune e inflamatória são reguladas pelas citocinas, de forma autócrina e parácrina, através da interação com receptores específicos presentes nos queratinócitos, fibroblastos, células de Langerhans, células endoteliais e linfócitos T infiltrados, promovendo a mobilização de leucócitos a partir do sangue e a ativação de outras células do tecido cutâneo (RANG *et al.*, 2007; UCHI *et al.*, 2000; WILLIAMS e KUPPER, 1996).

Estas citocinas secretadas pelos queratinócitos se difundem pela camada basal até atingir a derme, onde irão estimular fibroblastos a produzirem mais citocinas, IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Todas estas citocinas produzidas irão se difundir pela vasculatura cutânea, informando às células endoteliais que uma resposta inflamatória está em andamento (SPELLBERG, 2000).

Também pode ocorrer ativação de linfócitos T locais e células de Langerhans que se localizam adjacentes às células T, desenvolvendo ação de apresentadoras de antígenos a estes linfócitos. Após ativação das células T, o meio de citocinas da epiderme torna-se significativamente mais complexo, uma vez que estas células irão produzir mais citocinas, interferon (IFN)- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e mais TNF- $\alpha$ , além de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-17, a qual promove aumento na secreção de IL-6 e IL-8 pelos queratinócitos, que são, então, estimulados a expressar moléculas de adesão como ICAM (Molécula de adesão intercelular). Concomitante, as defesas locais são rapidamente ativadas pelo recrutamento de macrófagos, que estimulados por citocinas oriundas da epiderme e por estímulos antigênicos, mobilizam seu citoesqueleto para tornarem-se móveis, acabando por secretar metaloproteinases e outras enzimas de degradação, que lhes permite romper o colágeno e outros componentes estruturais e assim atravessar em direção a epiderme. Enquanto isto, as células de Langerhans ativadas irão fazer o caminho contrário aos macrófagos, deixando a epiderme em direção aos linfonodos, onde irão encontrar células T conservadas e irão apresentar o antígeno, voltando, posteriormente, ao compartimento dérmico. Ao mesmo tempo, a vasculatura dérmica iniciará um processo chamado de defesas sistêmicas (SPELLBERG, 2000).

Os metabólitos do AA (prostanóides) também desempenham um papel importante no processo inflamatório cutâneo, uma vez que estes mediadores possuem uma ampla ação mediada por receptores específicos presentes em células-alvo. Os prostanóides são abundantemente produzidos na pele, onde seus receptores também estão expressos de forma considerável. Mesmo assim, o papel fisiológico dos prostanóides no tecido cutâneo ainda não está totalmente esclarecido (KABASHIMA e MIYACHI, 2004).

A produção das prostaglandinas e dos leucotrienos é iniciada com a liberação do AA a partir dos fosfolipídios de membrana, através de uma reação catalisada pela fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Esta enzima é ativada em resposta a vários estímulos, tais como a ação da trombina nas plaquetas, do fator do complemento C5a (C5a) nos neutrófilos, da bradicinina nos fibroblastos, das reações antígeno-anticorpo nos mastócitos e da lesão celular promovida por diferentes agentes (ERO, UV-B, agentes químicos, etc) (RANG *et al.*, 2007). O AA liberado serve de substrato para as duas isoformas da enzima cicloxigenase (COX-1 e COX-2), onde é convertido em prostaglandinas e tromboxanos (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>), e também para a 5-lipoxigenase (5-LOX), sendo convertido em leucotrienos (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) por essa via metabólica. Na pele normal, a COX-1 está distribuída em toda a epiderme, enquanto a COX-2 se localiza principalmente nos queratinócitos supra-basais, sendo prontamente induzida frente a um estímulo inflamatório (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; LEE *et al.*, 2003).

A principal prostaglandina presente no tecido cutâneo é a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), a qual modula vários eventos inflamatórios cutâneos, como o aumento da permeabilidade vascular e a vasodilatação, o que contribui na formação do edema e na adesão e diapedese dos neutrófilos e monócitos. Porém, o tráfego dos linfócitos para o espaço intersticial a partir do lúmen pós capilar já é um processo mediado em parte pelo LTB<sub>4</sub> (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; LEE *et al.*, 2003). Já as PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> induzem a transcrição de enzimas requeridas para a síntese de outra classe de eicosanóides envolvida na fase de resolução do processo inflamatório, como as lipoxinas (SERHAN e SAVILL, 2005).



Outros mediadores químicos também desempenham uma ação importante durante o processo inflamatório cutâneo, como a histamina. Esta atua em muitos processos fisiológicos celulares, além de intervir nas reações alérgicas e na inflamação, sendo este um dos principais motivos dos mastócitos estarem localizados de maneira estratégica na microvasculatura dos tecidos que estão em contato com o meio externo, como a pele, os pulmões e intestinos. Reações inflamatórias ou alérgicas promovem a liberação de histamina através da interação de fatores do sistema complemento (C3a e C5a) e de antígenos com anticorpos IgE fixados nos mastócitos. Após a degranulação dos mastócitos, a histamina atua em receptores específicos, denominados receptores histaminérgicos, promovendo a constrição do músculo liso, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e prurido (RANG *et al.*, 2007; SILVA e CARVALHO, 2004; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Também há outros mediadores químicos que participam da regulação dos processos vasculares, contribuindo para a resposta inflamatória, como a serotonina, substância P e neurocinina A (HOLZER, 1991).

Num estado fisiológico normal, a resposta inflamatória é benéfica, uma vez que protege o tecido contra danos. Entretanto, a falha em qualquer um dos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória poderá fazer com que este processo, inicialmente resolutivo, desregule a homeostase do tecido, predispondo o mesmo a desenvolver um processo inflamatório crônico (MUELLER, 2006; DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; ROBERT e KUPPER, 1999). Uma variedade de condições patológicas internas e sistêmicas pode ser refletida na pele. Estas incluem: diabetes mellitus, arterosclerose, doenças inflamatórias, AIDS, estresse mental e envelhecimento. Desta forma, a pele serve como um indicador de desordens endógenas e, nela também, refletem-se os danos oriundos da produção excessiva de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) (PORTUGAL *et al.*, 2007).

Um aumento nos níveis de ERO na pele pode levar a danos celulares que promovem várias condições patológicas, como respostas inflamatórias (SONG *et al.*, 2008). Acrescentando, Portugal *et al.* (2007) descreve que a super produção ou remoção ineficiente de radicais livres ou ERO, denominada estresse oxidativo, contribui para surgimento de condições lesivas à pele, expressadas por eritema, edema,

envelhecimento, inflamação, manifestação auto-imune, hipersensibilidade, queratinização anormal e câncer de pele.

Radicais livres e ERO são constantemente formados nas células por metabolismo celular e degradação química espontânea de algumas biomoléculas. Estas são produzidas durante o metabolismo celular normal, reações imunes e várias condições patológicas, tais como pós- isquemia, onde a reperfusão leva à produção maciça de radical superóxido (GROS *et al.*, 2002).

Em níveis baixos, os ERO participam de uma série de processos celulares, tais como sinal de transdução, proliferação celular, apoptose, resposta imune e diferenciação celular. Porém, ERO e outros radicais livres são compostos quimicamente instáveis e, por isto, altamente reativos. Estes apresentam meia-vida e reatividade química características, entretanto eventualmente tornam-se estáveis, promovendo reações biológicas lesivas (JUNG *et al.*, 2007).

Alguns radicais livres são suficientemente estáveis para difundirem-se através de membranas biológicas, enquanto outros são tão reativos que realizam reações químicas no próprio ambiente onde são formados. Desta forma, radicais livres altamente reativos (radicais hidroxila) causam dano biológico apenas se gerados próximos ao alvo potencial, como, por exemplo, DNA, porque são imediatamente removidos pelos compostos orgânicos presentes nas células em grandes concentrações. Já radicais livres de reatividade intermediária são capazes de percorrer distâncias significativas, podendo, então, reagir com moléculas específicas, sendo estas as espécies com maior poder de causar dano biológico e quando em excesso podem provocar efeitos deletérios sobre as células, levando à morte celular (JUNG *et al.*, 2007).

Neste contexto, nosso organismo apresenta vários mecanismos de defesa contra ERO. Estes incluem moléculas antioxidantes, sistemas seqüestradores de ERO e reparadores de danos. As células possuem mecanismos protetores enzimáticos e não enzimáticos; enzimas antioxidantes incluem número limitado de proteínas: superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPX) e glutathione redutase (GR); antioxidantes não enzimáticos incluem glutathione reduzida (GSH). Este grupo é maior do que o grupo das enzimas e possui diversos atributos, como capacidade de penetrar

e atingir locais específicos da célula, onde o estresse oxidativo possa ocorrer. Mas ambos os grupos apresentam amplo espectro de ação, podendo agir por diversos mecanismos, sendo capazes de evitar dano oxidativo por interação direta ou indireta com ERO (NOGUÉS *et al.*, 2002).

### **1.3 *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi**

Há muito tempo, as plantas medicinais têm sido usadas como medicamentos para o tratamento de doenças e ainda desenvolvem papel fundamental para a saúde da população mundial. A diversidade química das plantas faz-lhes uma das principais fontes para o isolamento de compostos orgânicos bioativos (BASSO *et al.*, 2005).

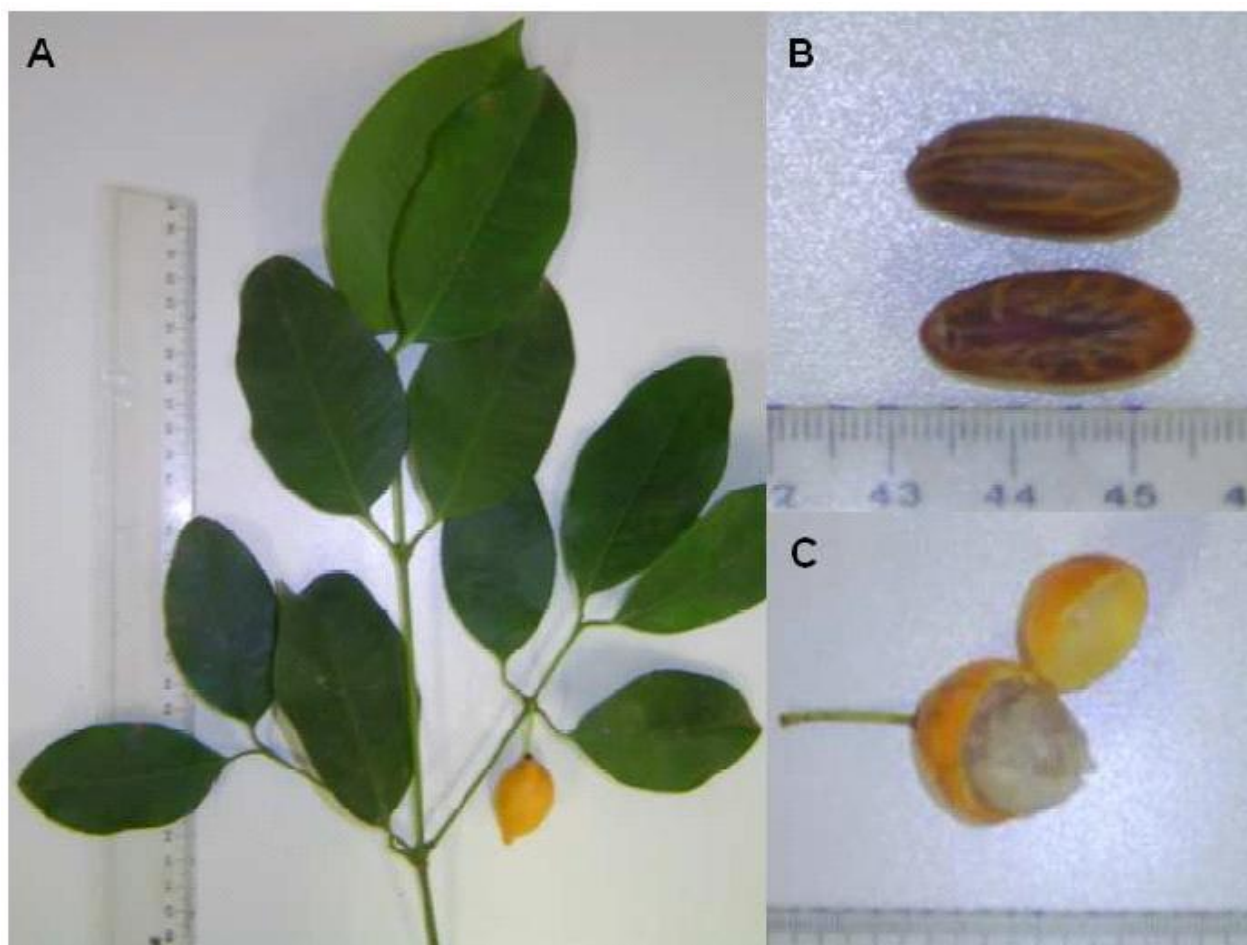
Cerca de 120.000 espécies de plantas superiores podem ser encontradas no Brasil, onde vários vegetais foram e ainda são utilizados pelos indígenas para o tratamento de seus males ou como veneno em suas guerras e caçadas (SARTI E CARVALHO, 2004).

Conforme estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), a medicina tradicional ou os medicamentos a base de plantas são utilizados como fonte primária de cuidados com a saúde por mais de 80% da população de países em desenvolvimento (WHO, 2002). Um estudo que avaliou o uso popular de plantas medicinais na floresta tropical brasileira revelou que 28% dos 290 preparados vegetais de 114 plantas medicinais são utilizados em situações que envolvem processos inflamatórios, como doenças do sistema respiratório, estados febris e reumatismo (DI STASI *et al.*, 2002). Considerando-se o valor histórico de compostos derivados de plantas como fontes de agentes antiinflamatórios, é de grande importância a busca por novas drogas que interfiram efetivamente com os processos inflamatórios (CALIXTO *et al.*, 2004).

Atualmente, em torno de 25 a 30% de todos os fármacos disponíveis na terapêutica são produzidos a partir de produtos naturais (plantas, animais e microorganismos) ou são derivações destes produtos. Entretanto, nas últimas décadas, em decorrência principalmente dos avanços na química combinatória, as pesquisas da indústria farmacêutica na área de produtos naturais têm apresentado declive lento. Porém, para algumas doenças complexas, evidências recentes de companhias

farmacêuticas mostram que os produtos naturais ainda representam uma fonte de extrema valia para produção de novas entidades químicas, visto que são compostos por estruturas químicas privilegiadas, selecionadas por milhões de anos de evolução (CALIXTO, 2005). Entre estas fontes ricas de novas entidades químicas está a Família Clusiaceae (ROBSON, 1990), a qual possui mais de 100 compostos isolados de cerca de 20 espécies diferentes, com atividades biológicas distintas, especialmente antiinflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas, antivirais e antidepressivas (GUSTAFSON *et al.*, 1992; ROCHA *et al.*, 1994; SUFFREDINI *et al.*, 2006). Um gênero da Família Clusiaceae é a *Garcinia*, comumente usado na medicina popular em várias desordens, incluindo constipação, reumatismo, inflamação e dor (CÔRREA, 1984; BITTAR *et al.*, 2000).

A *Garcinia gardneriana* pode ser encontrada sob a sinonímia botânica de *Rheedia gardneriana*, da família Guttiferae. Popularmente, é conhecida como “bacupari”, “bacopari”, “bacupary miúdo” ou “mangostão amarelo”. Trata-se de uma árvore de porte médio, copa piramidal, folhas opostas, pecioladas, que floresce nos meses de agosto a setembro, sendo seu fruto amarelo com polpa mucilaginosa, branca, comestível (Figura 3). O bacupari é nativo do interior da mata atlântica, sendo encontrado facilmente na beira de rios e córregos (CORRÊA, 1984; GUIMARÃES *et al.*, 2004).



**Figura 3: Partes aéreas da *Garcinia gardneriana* (Pl. & Tr.) Zappi.** Folhas e fruto (A); foco da semente (B); foco do fruto mostrando a polpa (C).

**Fonte:** Cortesia Prof. Dr. Michel F. Otuki.

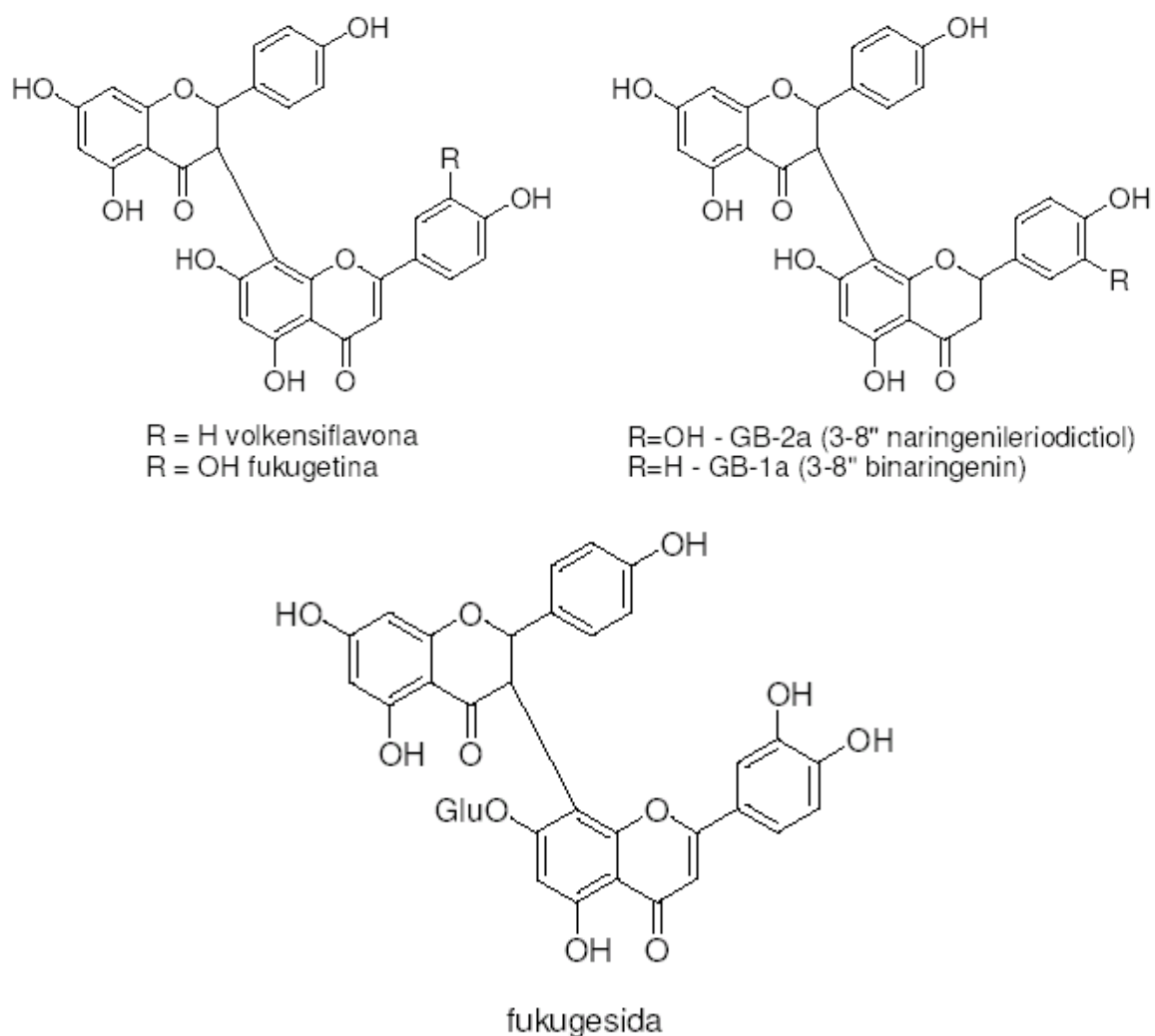
Estudos fitoquímicos realizados com a *G. gardneriana* revelaram a presença de diversas xantonas, os triterpenos lupeol e betulina, e o esteróide  $\beta$ -sitosterol, nas cascas e madeira da planta (BRAZ FILHO *et al.*, 1970; DELLE MONACHE *et al.*, 1984). Ainda foram identificados flavonóides como os biflavonóides volkensiflavona, 13-naringenina-11 $\beta$ -eriodictiol (GB-2a), GB-1a, fukugetina (moreloflavona), presentes principalmente nas suas folhas (BOTTA *et al.*, 1984), onde também existem fukugesida (LUZZI *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 2000) e 13-naringenina-11 $\beta$ -4'-Ome-eriodictiol (GB-2a-11 $\beta$ -4'-OMe) implicados como os principais constituintes químicos responsáveis pelas propriedades analgésicas desta planta (CECHINEL FILHO *et al.*, 2000).

As folhas constituem a parte mais utilizada da *G. gardneriana* na medicina popular, sendo que estas possuem biflavonóides com significativa ação analgésica na

segunda fase do teste da formalina (dor inflamatória) (LUZZI *et al.*, 1997). O biflavonóide isolado das folhas 13-naringenina-118-4'-OMe-eriodictiol (GB-2a-11-4'-OMe) apresentou efeitos analgésicos dependentes da dose, no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste da formalina (CECHINEL FILHO *et al.*, 2000).

Ainda observou-se que os flavonóides fukugetina, fukugesida e volkensiflavona, entre outros, isolados das folhas de *G. gardneriana* apresentam atividade antibacteriana contra diversas bactérias gram-positivas (VERDI *et al.*, 2004). Em outro estudo, verificou-se que o composto isolado 7-epiclusianona apresentou, em baixas concentrações, efeito vasodilatador dependente do endotélio sobre anéis de aortas isoladas de ratos; enquanto, em altas concentrações, com a Óxido Nítrico Sintase (NOS) inibida, houve vasoconstrição, que foi anulada por inibidores seletivos da COX e 5-LOX. Assim, o NO parece participar da vasodilatação, enquanto o efeito vasoconstritor pode ser mediado por produtos derivados da COX e 5-LOX endoteliais (CRUZ *et al.*, 2006).

O extrato hidroalcolólico das folhas da *G. gardneriana* e os biflavonóides, fukugetin e GB-2a (Figura 4), também apresentaram ação antiinflamatória ao reduzir o edema de pata provocado pela aplicação intraplantar de carragenina. Ainda, foram capazes de reduzir a infiltração de neutrófilos no sítio da inflamação e reduziram o edema promovido por outros agentes flogísticos, como substância P, bradicinina, histamina e TPA (12-O-tetradecanoilforbol acetato). Parte deste efeito pode ser atribuída aos biflavonóides fukugetin e GB-2a, entretanto também, provavelmente, deve-se à ação sinérgica dos diversos compostos presentes nas folhas desta planta (CASTARDO *et al.*, 2008).



**Figura 4:** Representação da estrutura química dos biflavonóides da *Garcinia gardneriana*.

**Fonte:** Castardo, 2007.

Apesar da *G. gardneriana* e de seus biflavonóides terem sido submetidos a alguns estudos farmacológicos, nenhum estudo que comprove a atividade antiinflamatória tópica dessa planta e justifique o seu uso pela população no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas foi realizado até o presente momento.





## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito antiinflamatório tópico do extrato hidroalcólico da *Garcinia gardneriana* (EHGG) e de dois biflavonóides isolados em modelos de inflamação cutânea aguda em camundongos, além de investigar os possíveis mecanismos envolvidos com a atividade antiinflamatória dessa planta.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito antiinflamatório do EHGG e seus biflavonóides, fukugetin e GB-2a, em modelo de edema de orelha mediado por óleo de cróton em camundongos;
- Avaliar a migração de células inflamatórias em tecido cutâneo no modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em camundongos tratados com o EHGG e com os biflavonóides;
- Avaliar a atividade do EHGG e seus biflavonóides isolados sobre a produção de ERO em pele tratada com óleo de cróton em camundongos;
- Avaliar a atividade seqüestradora de radicais livres do EHGG das folhas e do fukugetin e GB-2a *in vitro*;
- Avaliar o efeito antiinflamatório do EHGG em modelos de edema de orelha mediados por outros agentes flogísticos, como AA, fenol e capsaicina;



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais e manutenção**

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss (25-35g) mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB-UFPR, em temperatura de  $22 \pm 2$  °C, respeitando uma fase clara/escuro de 12 horas, onde receberam água e ração comercial (Nuvital) *ad libitum*. Antes do início dos experimentos os animais foram mantidos no laboratório por um período de pelo menos 1 hora para adaptação. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios, determinados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR (CEEAA). O presente projeto foi avaliado pelo mesmo e aprovado sob o protocolo número 315.

#### **3.2 Classificação botânica**

A *G. gardneriana* foi coletada na cidade de Blumenau e identificada pelo professor Marcos Sobral (Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre). Um exemplar está catalogado no herbário Dr. Roberto Miguel Klein (Departamento Ciências Naturais, FURB, Blumenau) sob os registros 534 a 540.

#### **3.3 Coleta, extração e preparo do material vegetal**

A obtenção dos extratos brutos hidroalcoólicos das folhas, cascas e sementes da *G. gardneriana* e a identificação, isolamento e purificação dos compostos foram realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho do Departamento de Química da Universidade do Vale de Itajaí, Itajaí.

Folhas, cascas e sementes de *Garcinia gardneriana*, provenientes da Mata Atlântica na Região do Vale do Itajaí, foram colhidas e depositadas no herbário da Universidade Regional de Blumenau, após lavagem, foram postas em estufa à 40 °C

para secagem. Em seguida, foram trituradas e deixadas em maceração por 7 dias em solução hidroalcoólica (50% v/v) em frascos de vidro âmbar, sendo agitadas periodicamente. Após a maceração, a mistura foi filtrada em papel filtro e concentrada através de um aparelho rotavapor (temperatura máxima de 50 °C). O extrato obtido passou por partição com solventes de polaridades crescentes, como o n-hexano, diclorometano e acetato de etila, sendo obtido o extrato semipuro.

### **3.4 Isolamento e purificação dos compostos**

Foram isolados possíveis princípios ativos com atividade antiinflamatória a partir dos extratos polares. O isolamento dos compostos deu-se através de procedimentos cromatográficos, como cromatografias em coluna usando sílica ou sefadex LH-20 como fase estacionária. A elucidação estrutural dos compostos foi realizada por métodos espectroscópicos usuais, como IV, H-RMN e <sup>13</sup>C-RMN. Como já citado, o isolamento e a purificação dos compostos foram realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho do Departamento de Química da Universidade do Vale de Itajaí, Itajaí.

### **3.5 Avaliação do edema de orelha**

O modelo animal *in vivo* mais utilizado para estudar o processo inflamatório cutâneo é a indução de edema na orelha de camundongos. Este modelo consiste num método rápido e simples que requer pouca quantidade de substâncias e permite resultados reprodutíveis. No que diz respeito à sua aplicação farmacológica, este modelo induzido por diferentes agentes (ex.: óleo de cróton, ácido araquidônico e fenol) permite uma variedade de modelos de inflamação cutânea apropriados para a avaliação tanto tópica como sistêmica de agentes sintéticos, extratos de plantas, bem como substâncias isoladas de plantas (GÁBOR, 2000; WINYARD e WILLOUGHBY, 2003).

O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura da orelha dos camundongos, calculada através da diferença da medida realizada após a indução do

edema por aplicação do agente flogístico e a medida basal, aquela realizada antes da sua aplicação. A espessura da orelha foi medida utilizando um micrômetro digital (Great MT – 04513). A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha e a sua espessura foi registrada em micrômetro ( $\mu\text{m}$ ). Para minimizar variações, as medições foram realizadas por um único experimentador. O EHGG, os compostos e os agentes flogísticos foram dissolvidos em 20  $\mu\text{L}$  de acetona e aplicados na orelha direita de camundongos.

### **3.5.1 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton**

O edema foi induzido na orelha direita de camundongos pela aplicação tópica de 0,1 mg de óleo de cróton dissolvido em 20  $\mu\text{L}$  de acetona. EHGG e compostos isolados e dexametasona (usada como controle positivo na doses de 0,1 mg/orelha) foram aplicados topicamente simultaneamente com óleo de cróton. O aumento da espessura da orelha foi medido após 6 horas da indução da inflamação.

### **3.5.2 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico (AA)**

O AA, bem como seus metabólitos, estão envolvidos na patogênese de várias doenças inflamatórias da pele, como verificada na dermatite atópica e psoríase (GABOR, 2000). Desta forma, o EHGG e indometacina (utilizada como controle positivo na dose de 2 mg/orelha) foram administrados topicamente após a aplicação do AA (2 mg/orelha) na orelha direita de camundongos. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 1 hora após a aplicação do agente flogístico, conforme sugerem estudos prévios (YOUNG *et al.*, 1984; CRUMMEY *et al.*, 1987).

### **3.5.3 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina**

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida), um alcalóide encontrado na pimenta vermelha, quando aplicada tópica ou localmente produz rapidamente uma sensação dolorosa associada à sensação de queimação. Esse efeito provém da

ativação de neurônios sensoriais de pequeno diâmetro e da liberação de mediadores neurogênicos da inflamação (ZEGARSKA *et al.*, 2006). Com o objetivo de avaliar o efeito EHGG em um modelo de inflamação cutânea neurogênica, o mesmo foi administrado 30 minutos antes da aplicação de 200 µg/orelha de capsaicina na orelha direita de camundongos. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 30 minutos após a aplicação do agente flogístico, dentro do estabelecido na literatura (GABOR e RAZGA, 1992).

### **3.5.4 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de fenol**

Os agentes irritantes são substâncias que agem localmente no tecido cutâneo ou mucosa produzindo inflamação. Assim, o modelo de edema de orelha induzido pelo fenol é um modelo animal de dermatite de contato (LIM *et al.*, 2004). Com o objetivo de avaliar o efeito do EHGG em um modelo de inflamação cutânea causado por um agente irritante, este foi administrado após a aplicação de uma solução de 10% (v/v) de fenol em acetona (20 µL/orelha) na orelha direita de camundongos. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 2 horas após a aplicação do agente irritante.

### **3.6 Medida da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)**

A metodologia de Bradley *et al.* (1982) modificada por De Young *et al.* (1989) foi utilizada para avaliar a atividade da enzima MPO, um indicativo da presença de leucócitos PMN. As amostras (círculos de 6 mm do tecido das orelhas de camundongos) foram adicionadas a 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM e pH 5,4 contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e homogeneizado por cerca de 45 s a 0 °C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. A amostra (1,5 mL) foi colocada em microtubo e centrifugada a 12000 x g a 4 °C por 15 min. Triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente adicionou-se 200 µL de uma mistura contendo 100 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4, 85 µL de PBS 0,22M pH 5,4 e 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. O início da

reação deu-se pela adição de 20 µL de tetrametilbenzidina HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%. Posteriormente a placa foi incubada a 37 °C por 3 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M pH 3 em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808) com comprimento de onda de 630 nm, sendo expressa em mDO/biópsia.

### **3.7 Análise histológica**

Foram coletadas amostras de orelhas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, as quais foram fixadas em solução ALFAC (álcool 80%, formol 40% e ácido acético glacial) num período de 16 horas, sendo em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 µm em um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. A infiltração de leucócitos, edema e espessura da epiderme foram avaliadas em áreas representativas com aumento de 200x e/ou 400x.

### **3.8 Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)**

A determinação de ERO foi baseada nos métodos de Song *et al.* (2008) com modificações. Este método determina diretamente a geração de oxigênio na forma de radicais livres usando o composto 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), o qual é sensível à presença de ERO, onde é convertido em composto altamente fluorescente DCFH (2', 7'-diclorofluoresceína) (SONG *et al.*, 2008). A produção de ERO em pele de camundongos foi determinada após 6 horas da aplicação do óleo de cróton em orelhas tratadas simultaneamente com acetona (veículo), EHGG, seus compostos fukugetin e GB-2a e vitamina E. As amostras (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão PBS, pH 7,2, por 45 segundos a 0 °C. Os homogenatos foram incubados com DCFH-DA (concentração final de 10 µM) durante 30 minutos. Em seguida, a conversão de DCFH-DA ao produto

fluorescente DCFH foi medida usando um espectrofotômetro com excitação em 485 nm e emissão em 530 nm.

### **3.9 Estudo *in vitro* da atividade seqüestradora de radicais livres (DPPH)**

Para avaliar a capacidade sequestradora de radicais livres do EHGG das folhas e dos biflavonóides fukugetin e GB-2a, utilizou-se o método do DPPH. Este se baseia na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico (BRAND-WILIAMS *et al.*, 1995). A análise das amostras de EHGG das folhas, fukugetin e GB-2a foi realizada em espectrofotômetro. Em modo triplicata, as amostras foram preparadas através da adição de 2,5 mL da solução da amostra e 1 mL da solução de DPPH 0,3 mM (em metanol e filtrada). A reação ficou em repouso em temperatura ambiente por 30 min para que ocorresse a reação. Após o tempo de repouso, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 518 nm (MENSOR, 2001).

### **3.10 Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), exceto para os valores das  $DI_{50}$  (dose necessária para reduzir em 50% as respostas inflamatórias dos grupos tratados em relação ao grupo controle), que foram representados como a média geométrica acompanhada de seu respectivo intervalo de confiança 95%. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de Newman Keuls quando necessário. Valores de P menores do que 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância.



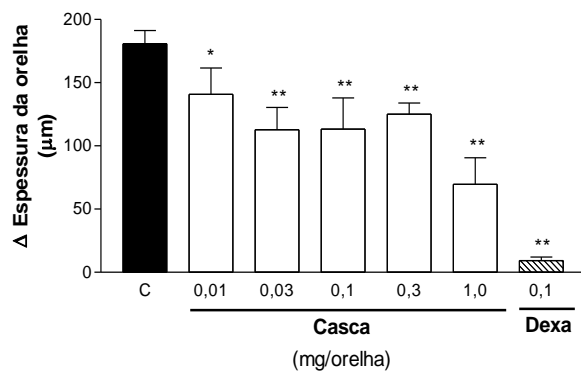


## 4. RESULTADOS

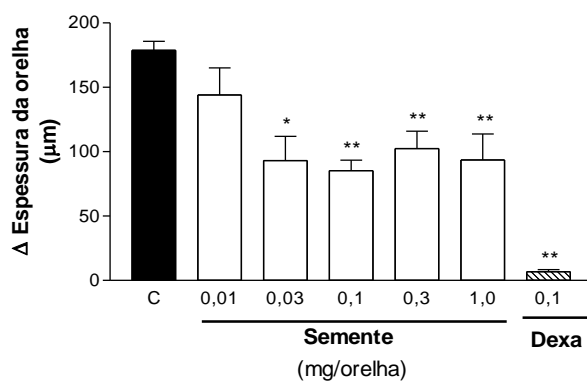
### 4.1 Efeito do EHGG no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton

A aplicação tópica do óleo de cróton na orelha dos camundongos promoveu um aumento significativo da sua espessura após a sexta hora do desafio com esse agente flogístico (Figura 5). Esse aumento foi efetivamente reduzido pela aplicação tópica do EHGG (0,01 – 1 mg/orelha) preparado a partir da casca, das sementes e das folhas. O EHGG das folhas mostrou-se mais efetivo, promovendo a inibição da formação do edema ( $I_{max}$ ) de  $70 \pm 3\%$  na dose de 0,3 mg/orelha e apresentando um valor de  $DI_{50}$  de 0,33 (0,1 – 0,55) mg/orelha, seguido pelo EHGG da casca, com  $I_{max}$  de  $60 \pm 12\%$  (dose 1 mg/orelha), e pelo EHGG das sementes, com  $I_{max}$  de  $51 \pm 5\%$  (dose 0,1 mg/orelha).

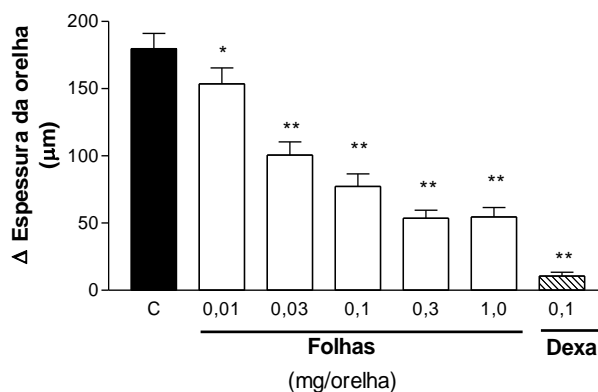
**A**



**B**



**C**

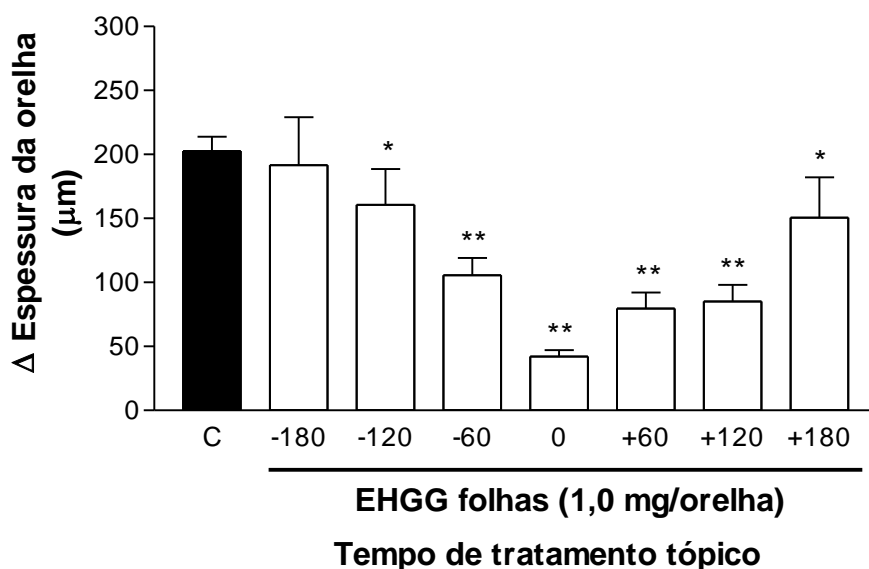


**Figura 5: Curva dose-resposta do EHGG no edema de orelha induzido por óleo de cróton.**

Os animais foram desafiados com o óleo de cróton (representado no gráfico com a letra C) e logo em seguida tratados com o EHGG (0,01 a 1 mg/orelha) da casca (A), das sementes (B) e das folhas (C) e com dexametasona (Dexa, 0,1 mg/orelha). Após 6 horas a espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrometro. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. (n = 5-10) do aumento da espessura da orelha em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). \* $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,001$  representam os níveis de significância em relação ao controle (C).

## 4.2 Avaliação tempo-resposta do EHGG das folhas no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton

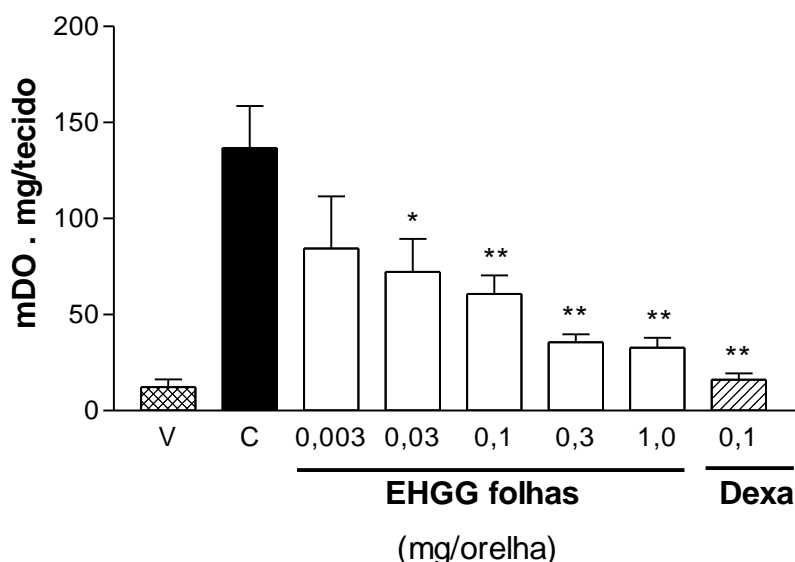
Posteriormente, foi avaliado o tempo-resposta do EHGG produzido a partir das folhas sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (Figura 6). O EHGG das folhas, na dose de 1 mg/orelha, administrado topicamente, foi capaz de reduzir o edema quando administrado até 120 minutos antes da aplicação do agente flogístico (-120), e mantém esta inibição quando administrado até 180 minutos após o óleo de cróton (+180). Entretanto, o efeito inibitório foi mais eficaz quando o EHGG das folhas foi aplicado no mesmo momento da aplicação do agente flogístico (Inibição de  $83 \pm 7\%$ ).



**Figura 6: Curva tempo-resposta do EHGG das folhas no edema de orelha induzido por óleo de cróton.** Os animais foram desafiados com o óleo de cróton (representado no gráfico com a letra C) e tratados com o EHGG das folhas (1 mg/orelha) em diferentes tempos (180 minutos antes a 180 minutos após aplicação tópica de óleo de cróton). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 5-10$ ) do aumento da espessura da orelha em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). \* $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,001$  representam os níveis de significância em relação ao controle (C).

### 4.3 Efeito do EHGG sobre a atividade da enzima MPO

A figura 7 mostra o efeito do EHGG das folhas sobre a atividade da enzima MPO, que é um marcador enzimático da infiltração de neutrófilos no tecido inflamado (LLORET e MORENO, 1995). Para tal, foram selecionadas as doses de 0,003 a 1 mg/orelha do EHGG, baseado no resultado obtido na curva dose-resposta do modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton (Figura 5C). A aplicação tópica do agente flogístico aumentou a atividade da MPO, a qual foi significativamente reduzida pela aplicação tópica do EHGG nas doses de 0,03; 0,1; 0,3 e 1 mg/orelha, e do controle positivo dexametasona (0,1 mg/orelha). A maior inibição do EHGG sobre a atividade da MPO foi de  $64 \pm 13$  % na dose 1 mg/orelha, enquanto a dexametasona inibiu  $91 \pm 3$ %.

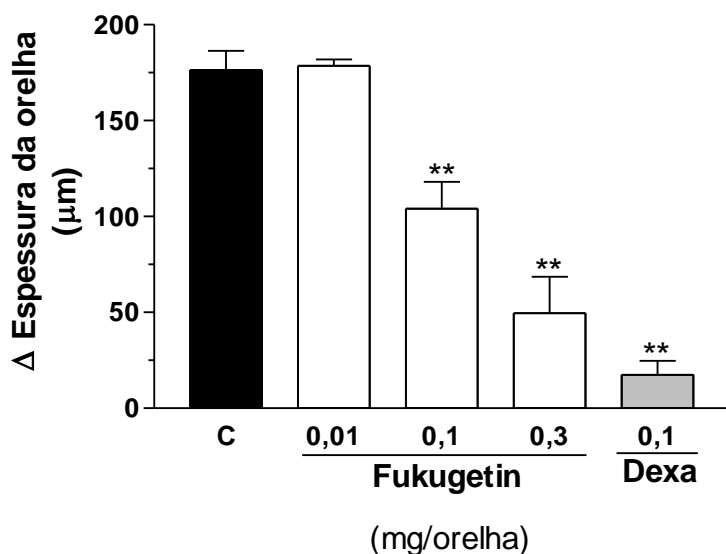


**Figura 7: Efeito do EHGG das folhas sobre o aumento na atividade da MPO induzida pelo óleo de cróton.** Os animais foram desafiados com o óleo de cróton (C) e logo em seguida tratados com o EHGG (0,003 a 1 mg/orelha) ou dexametasona (Dexa, 0,1 mg/orelha). Após 24 horas foram obtidas amostras das orelhas para avaliação da atividade da MPO. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. (n = 6-8). Animais tratados com o veículo (V). \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$  representam os níveis de significância em relação ao controle (C).

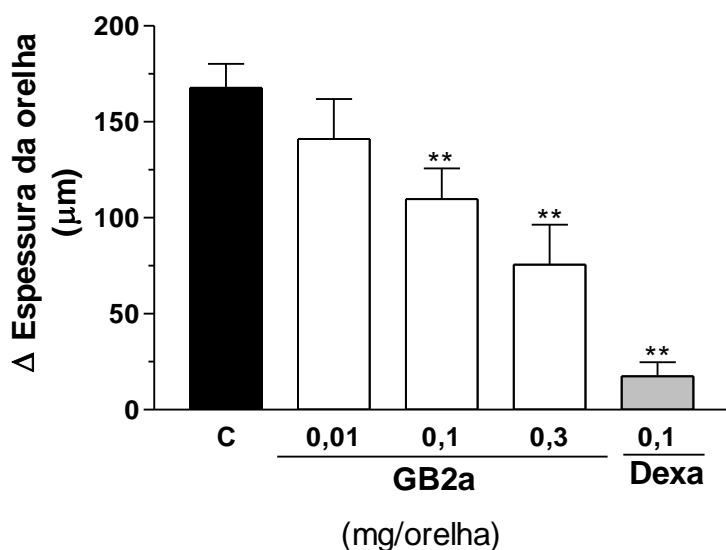
#### **4.4 Efeito tópico dos biflavonóides da *Garcinia gardneriana* no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton**

Após a constatação da atividade antiinflamatória do EHGG, foi verificado o efeito dos biflavonóides obtidos a partir do EHGG das folhas no mesmo modelo de edema de orelha, com o objetivo de avaliar a participação destes compostos na atividade antiinflamatória do extrato. A figura 8 demonstra que tanto o fukugetin como o GB-2a foram capazes de reduzir o edema induzido por este agente flogístico, quando administrados topicamente, apresentando valores de  $DI_{50}$  de 0,18 (0,10-0,28) e 0,22 (0,15-0,31) mg/orelha; e  $I_{max}$  obtida na dose de 0,3 mg/orelha foi de  $71 \pm 4\%$  e  $58 \pm 6\%$ , respectivamente.

A



B



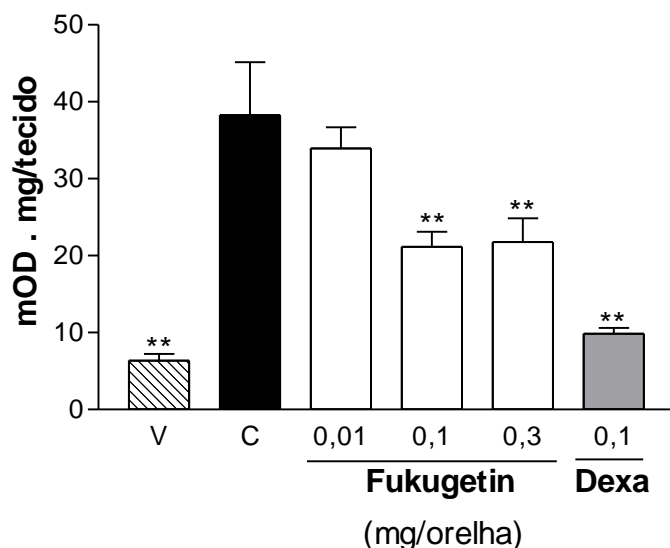
**Figura 8: Efeito dos biflavonóides fukugetin e GB-2a sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton.** Os animais foram desafiados com o óleo de cróton (representado no gráfico com a letra C) e logo em seguida tratados com o fukugetin (0,01 a 0,3 mg/orelha), GB-2a (0,01 a 0,3 mg/orelha) ou dexametasona (Dexa, 0,1 mg/orelha). Após 6 horas a espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrometro. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. (n = 5-10) do aumento da espessura da orelha em micrômetros ( $\mu$ m). Animais tratados com o veículo (V). \*p<0,05 e \*\*p<0,001 representam os níveis de significância em relação ao controle (C).

#### 4.5 Efeito tópico dos biflavonóides da *Garcinia gardneriana* na atividade da enzima MPO

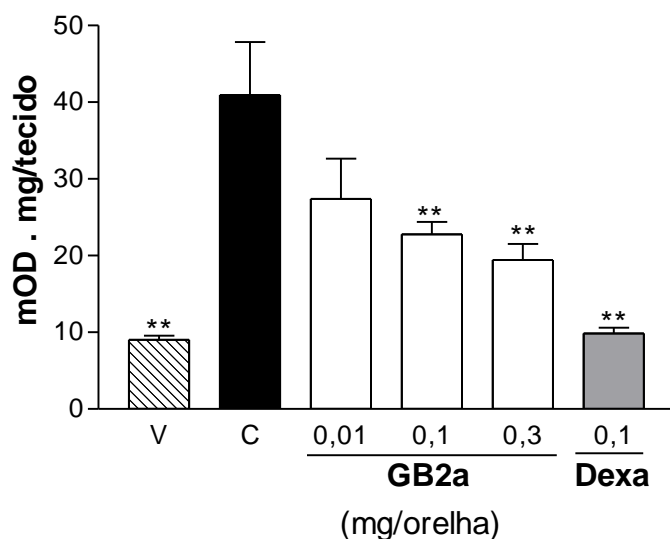
A figura 9 mostra que a aplicação tópica do fukugetin e GB-2a promoveu inibição da atividade da enzima MPO, com valores de  $DI_{50}$  de 0,28 (0,12-0,41) e 0,16 (0,09-0,27) mg/orelha, com inibição de  $52 \pm 6\%$  e  $64 \pm 5\%$ , respectivamente, para fukugetin (0,1 mg/orelha) e GB-2a (0,3 mg/orelha).



**A**



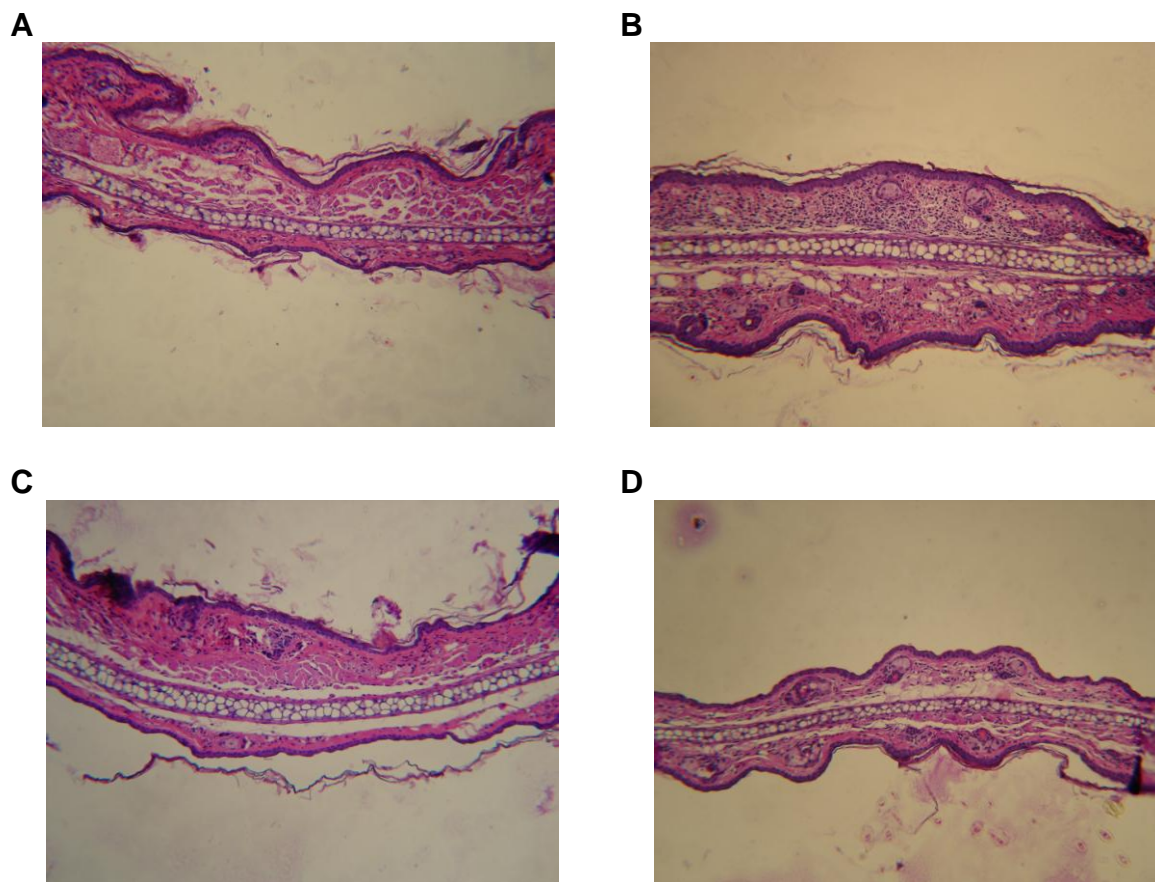
**B**



**Figura 9: Efeito dos biflavonóides fukugetin e GB-2a sobre o aumento na atividade da MPO induzida pelo óleo de cróton.** Os animais foram desafiados com o óleo de cróton (representado no gráfico com a letra C) e logo em seguida tratados com o fukugetin (0,01 a 0,3 mg/orelha), GB-2a (0,01 a 0,3 mg/orelha) ou dexametasona (Dexa, 0,1 mg/orelha). Após 24 horas, foram obtidas amostras das orelhas para avaliação da atividade da MPO. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. (n = 5-10) do aumento da espessura da orelha em micrômetros ( $\mu$ m). Animais tratados com o veículo (V). \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$  representam os níveis de significância em relação ao controle (C).

#### 4.6 Análise histológica

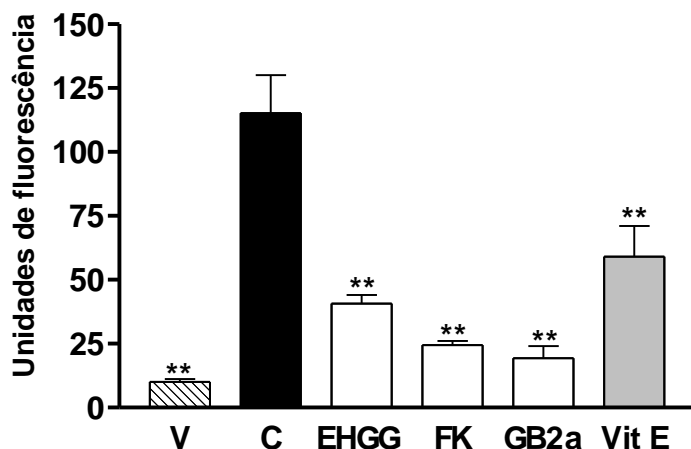
Para confirmação do efeito antiinflamatório do EHGG verificado nos experimentos anteriores, foi realizada a análise histológica dos parâmetros de inflamação relativos ao tratamento com o extrato. A análise dos cortes histológicos das orelhas dos camundongos demonstrou que após 24 horas da aplicação tópica do óleo de cróton ocorreu formação intensa de edema, bem como pronunciada infiltração celular na derme (figura 10B). A histologia também revelou que os parâmetros inflamatórios (edema e infiltração celular) foram suprimidos pela aplicação tópica do EHGG (1 mg/orelha) (figura 10C), bem como pelo controle positivo dexametasona (0,05 mg/orelha) (figura 10D).



**Figura 10: Análise histológica do efeito do EHGG das folhas sobre o infiltrado leucocitário no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton.** Fotos representativas de cortes transversais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x, escala de 100  $\mu$ m) coletadas 24 horas após a aplicação do óleo de cróton. (A) veículo, (B) controle (óleo de cróton), (C) animal tratado com EHGG (1 mg/orelha) ou (D) dexametasona (0,05 mg/orelha).

#### 4.7 Efeito antioxidante do EHGG das folhas e dos biflavonóides fukugetin e GB-2a

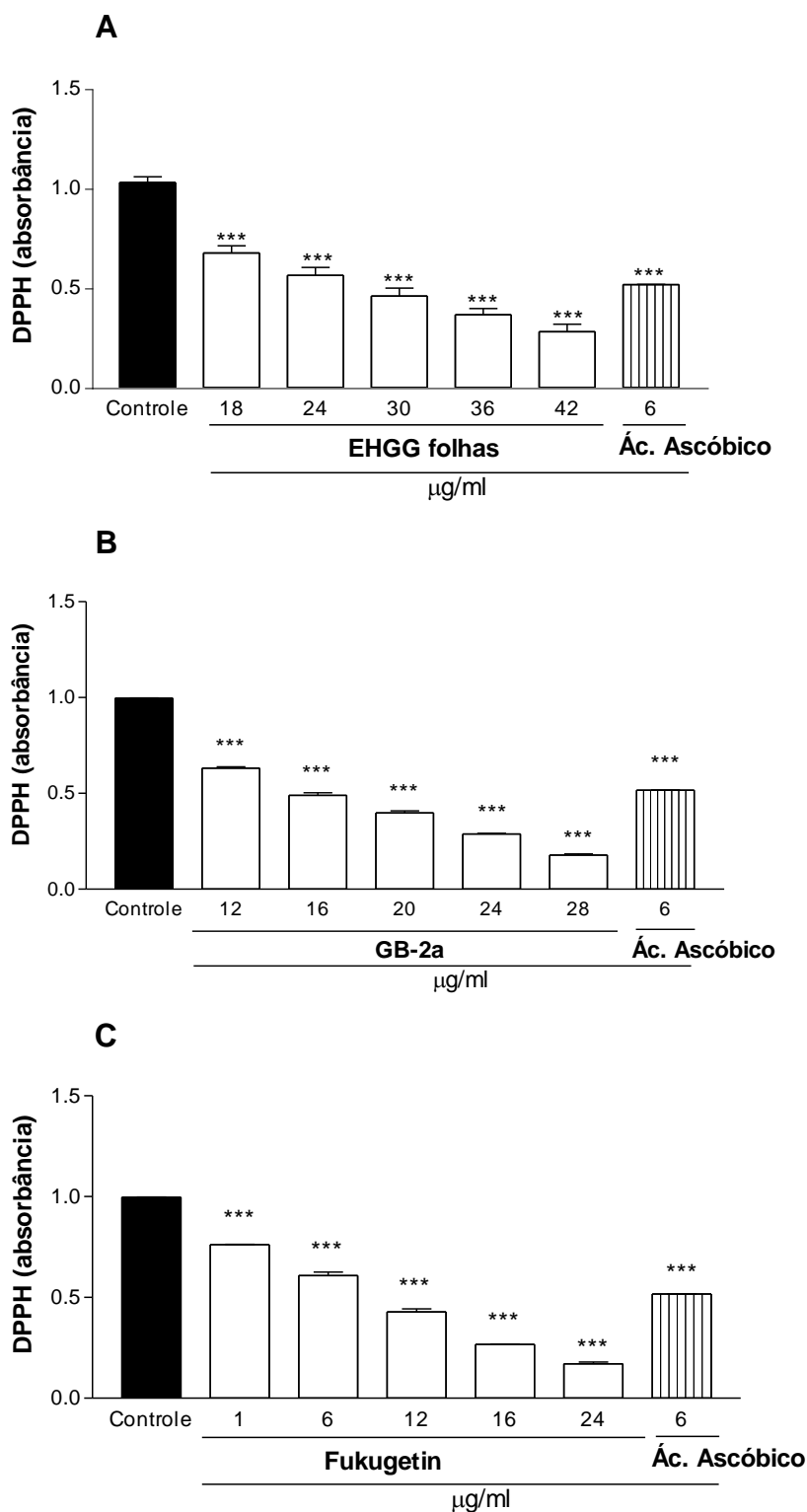
A figura 7 mostra que o EHGG das folhas, os biflavonóides, fukugetin e GB-2a, e a vitamina E (controle positivo), reduziram significativamente a formação de ERO, conforme verificado com a diminuição de intensidade de fluorescência emitida pelo composto fluorescente DCFA. Enquanto o EHGG das folhas foi capaz de inibir a produção de ERO em  $52 \pm 15\%$ , os biflavonóides mostraram-se mais eficazes, sendo que o fukugetin apresentou inibição de  $63 \pm 17\%$  e o GB-2a de  $83 \pm 4\%$ . A vitamina E mostrou-se a menos eficaz na dose utilizada ( $40 \pm 12\%$ ).



**Figura 11: Efeito antioxidante do EHGG das folhas e dos biflavonóides fukugetin e GB-2a em modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton.** Os animais foram desafiados com o óleo de cróton (C) e logo em seguida tratados com o EHGG (1 mg/orelha), fukugetin (FK) (0,3 mg/orelha), GB-2a (0,3 mg/orelha) e com o controle positivo vitamina E (vit E) (0,3 mg/orelha). Animais tratados com o veículo (V). \*\*p<0,001 representa o nível de significância em relação ao grupo controle (C).

#### **4.8 Avaliação da atividade seqüestradora de radicais livres do EHGG *in vitro***

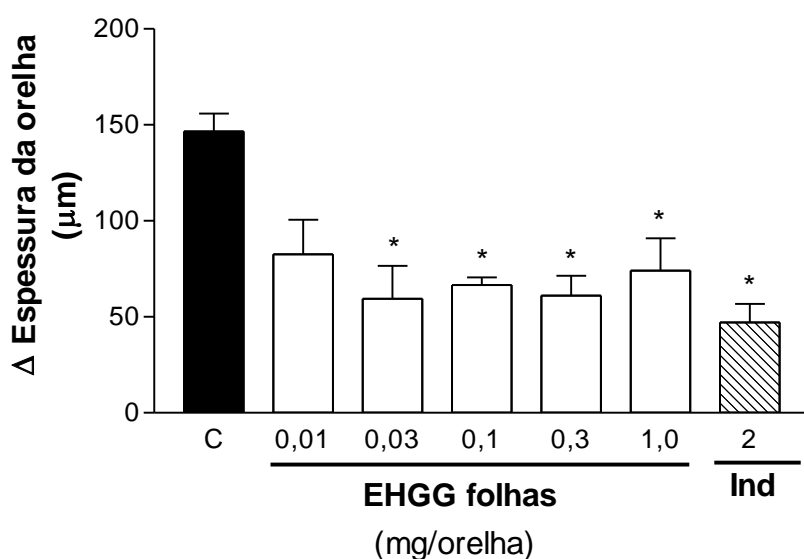
A capacidade antioxidante do ácido ascórbico (6 µg/mL), do EHGG e dos biflavonóides fukugetin e GB-2a (diferentes concentrações), foi observada através da redução de DPPH em relação ao grupo controle (Figura 12). O EHGG apresentou I<sub>max</sub> de 72,7 ± 0,3 % (42 µg/ml), enquanto os biflavonóides mostraram-se mais efetivos com I<sub>max</sub> de 82,6 ± 0,5 % (28 µg/ml) e 83,5 ± 0,7 % (24 µg/ml) para GB-2a e fukugetin, respectivamente. O fukugetin mostrou-se mais potente, com CE<sub>50</sub> de 12,0 (11,9 – 12,1) µg/ml, seguido pelo GB-2a com CE<sub>50</sub> 20,0 (19,8 – 20,2) µg/ml e EHGG das folhas com CE<sub>50</sub> 34,83 (34,56 – 35,1) µg/ml. O controle positivo, ácido ascórbico, na concentração utilizada apresentou inibição na ordem de 38 ± 12%.



**Figura 12: Efeito antioxidante do EHGG das folhas e dos biflavonóides, fukugetin e GB-2a, sobre o DPPH *in vitro*.** Foi avaliada *in vitro* a capacidade seqüestradora de espécies reativas de oxigênio do EHGG (A), do GB-2a (B) e do fukugetin (C). **C** corresponde ao grupo controle. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) das absorbâncias. \*\*\*  $p < 0,0001$  representa o nível de significância em relação ao controle ( $n=3$ ).

#### 4.9 Efeito do EHGG das folhas no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico

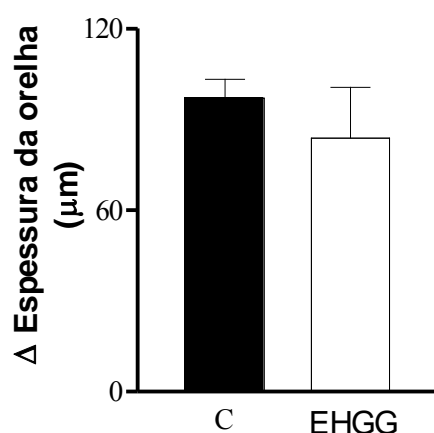
O AA promoveu a formação do edema após 1 hora da sua aplicação tópica, da mesma forma que descrito na literatura (YOUNG *et al.*, 1984; CRUMMEY *et al.*, 1987). A aplicação tópica do EHGG (0,01 a 1 mg/orelha) no edema induzido pelo AA, foi capaz de promover inibição do edema de orelha, apresentando  $I_{max}$  de  $57 \pm 10\%$  na dose de 0,03 mg/orelha (Figura 13). O controle positivo indometacina (2 mg/orelha) reduziu o edema do ácido araquidônico em  $62 \pm 8\%$ .



**Figura 13: Curva dose-resposta do EHGG das folhas no edema de orelha induzido por ácido araquidônico.** Os animais foram desafiados com o AA (2 mg/orelha) e logo em seguida tratados com o EHGG (0,01 a 1 mg/orelha) ou indometacina (Ind, 2 mg/orelha). Após 1 hora a espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrometro. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. (5-10) do aumento da espessura da orelha em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). \* $p < 0,01$  representa o nível de significância em relação ao controle (C).

#### 4.10 Efeito do EHGG das folhas no modelo de edema de orelha induzido por capsaicina

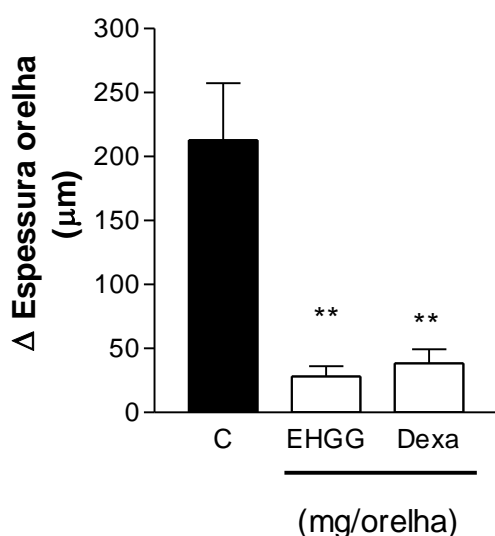
A aplicação tópica da capsaicina (200  $\mu\text{g}$ /orelha) induziu a formação de edema no tempo de 30 minutos. O pré-tratamento dos animais com 1 mg/orelha do EHGG das folhas não preveniu a formação do edema induzido pela capsaicina, conforme demonstrado na figura 14.



**Figura 14: Efeito do EHGG das folhas no edema de orelha induzido por capsaicina.** Os animais foram pré-tratados com o EHGG (1 mg/orelha) por via tópica 30 minutos antes da aplicação da capsaicina (200  $\mu\text{g}$ /orelha). Após 30 minutos do desafio com a capsaicina, a espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrômetro. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 5-8$  animais) do aumento da espessura da orelha em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ).

#### 4.11 Efeito do EHGG das folhas no modelo de edema de orelha induzido por fenol

Conforme mostrado na figura 15, há uma formação intensa de edema na orelha dos animais do grupo controle 2 horas após a aplicação tópica do fenol. Em contrapartida, a aplicação tópica do EHGG das folhas (1 mg/orelha) promoveu inibição significativa da formação do edema induzido pela aplicação do fenol, com inibição de  $81 \pm 6\%$ . O tratamento com dexametasona reduziu  $78 \pm 6\%$  o edema do fenol (Figura 15).



**Figura 15: Efeito do EHGG das folhas no edema de orelha induzido por fenol.** O edema foi induzido pela aplicação tópica de uma solução a 10% de fenol (20  $\mu$ L/orelha), seguido da aplicação do EHGG (1 mg/orelha) ou dexametasona (Dexa, 0,1 mg/orelha). Após 2 horas a espessura da orelha dos animais foi medida com o auxílio de um micrometro. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. (n = 5-10 animais) do aumento da espessura da orelha em micrômetros ( $\mu$ m). \*\*  $p < 0,001$  representa o nível de significância em relação ao controle.





## 5. DISCUSSÃO

Atualmente, cerca de 25 a 30% de todos os fármacos disponíveis são produzidos a partir de produtos naturais ou são derivações destes produtos (CALIXTO, 2005). Compostos derivados de plantas possuem valor histórico como fontes de agentes antiinflamatórios, o que torna ainda mais relevante a busca por novas drogas que interfiram efetivamente em processos inflamatórios (CALIXTO *et al.*, 2004).

A *Garcinia gardneriana* Planch & Triana apresenta várias indicações populares, sendo uma delas, o uso em quadros inflamatórios. Estudos realizados com seus extratos e compostos isolados têm confirmado estas indicações (GUIMARÃES *et al.*, 1996). Desta forma, justifica-se a avaliação do potencial antiinflamatório tópico dos extratos da *Garcinia gardneriana* e alguns de seus compostos isolados frente ao modelo experimental de edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos.

O edema pode ser utilizado como parâmetro de avaliação em modelos experimentais, pois possibilita uma avaliação do potencial antiinflamatório de vários compostos, sejam eles sintéticos, extratos de plantas ou compostos isolados, quando administrados por via tópica ou sistêmica, e também porque consiste em um dos sinais clássicos que caracterizam o processo inflamatório, sendo os demais: calor, eritema e dor (GÁBOR, 2000; DE YOUNG *et al.*, 1989). A utilização do modelo de edema de orelha apresenta ainda a vantagem, quando se busca o desenvolvimento de um composto com atividade tópica, de identificar se este possui absorção cutânea apropriada, para conseqüentemente atingir concentrações adequadas na pele a fim de exercer um efeito farmacológico (BOUCLIER *et al.*, 1990).

Neste trabalho, foram utilizados agentes flogísticos de ação tópica capazes de induzir inflamação local. Isto é decorrente da produção de mediadores pró-inflamatórios que promovem vasodilatação, infiltração de células PMN e extravasamento de plasma, levando à instalação dos sinais clássicos da inflamação (DE BERNARDIS *et al.*, 1994; FURSTENBERGER *et al.*, 1994). Assim, por mimetizarem condições observadas em alguns tipos de dermatites de ocorrência em humanos, modelos experimentais de inflamação cutânea são úteis na identificação de compostos com potencial atividade

antiinflamatória que possam compor a terapêutica de doenças inflamatórias (VANE, 2000; BOUCLIER *et al.*, 1990; CARLSON *et al.*, 1985).

A aplicação tópica do óleo de cróton promove a formação de edema e uma intensa infiltração leucocitária, e ainda envolve a alteração do crescimento e diferenciação dos queratinócitos. Sendo assim, a resposta hiperproliferativa nesse modelo assemelha-se a algumas doenças de pele como a psoríase (GÁBOR, 2000). O óleo de cróton é obtido da planta *Croton triglium* L. e seu principal princípio ativo é o TPA (GÁBOR, 2003). A aplicação tópica do TPA produz uma resposta inflamatória cutânea caracterizada por vasodilatação e formação de eritema ainda nas primeiras duas horas, com posterior extravasamento celular que resulta em aumento da espessura da orelha, sendo o pico máximo atingido na sexta hora, com redução até os valores basais após 24 horas. Além disto, verifica-se também aderência dos leucócitos PMN na parede dos vasos e degranulação de mastócitos entre a 4<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> hora. Entretanto, a infiltração máxima de leucócitos PMN no tecido é atingida somente 24 horas após a aplicação tópica do TPA (YOUNG *et al.*, 1983).

O mecanismo pelo qual o TPA exerce seu efeito é decorrente da ativação da PKC e da ativação seqüencial da via da MAP quinase, fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), indução da expressão da COX-2 e translocação/ativação da LOX, o que culmina na síntese e liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação de edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular, sendo estas as características da resposta inflamatória induzida pela aplicação tópica do TPA (MURAKAWA *et al.*, 2006; DE BERNARDIS *et al.*, 1994). A ativação da via da MAPK pela PKC promove a ativação de alguns fatores de transcrição nuclear, como o NF-κB e a AP-1, os quais atuam na regulação da produção de diversas proteínas pró-inflamatórias, tais como algumas citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-α), enzimas pró-inflamatórias (COX-2, iNOS) e moléculas de adesão (PASCUAL e GLASS, 2006; GLASS e OGAWA, 2006; GARCIA-PIÑERES *et al.*, 2001; SANCHEZ e MORENO, 1999). A fosforilação da PLA<sub>2</sub> pela PKC provoca a liberação do ácido araquidônico (AA) seguida da produção de prostaglandina (PG) e leucotrieno (LT) via COX e LOX, respectivamente (WANG *et al.*, 2001; YOUNG *et al.*, 1984).

O aumento dos níveis teciduais dos metabólitos do AA, principalmente a PGE<sub>2</sub> e o LTB<sub>4</sub>, parece ser essencial para que o processo inflamatório se inicie após a aplicação do TPA (MURAKAWA *et al.*, 2006), uma vez que os produtos via LOX (LT) são necessários para o extravasamento plasmático e conseqüente formação do edema e infiltração leucocitária, considerando a ação vasodilatadora da PGE<sub>2</sub> que contribui no aumento do fluxo sanguíneo (YOUNG *et al.*, 1984). Evidências mais recentes demonstram que a resposta inflamatória do tipo persistente, característica nesse modelo, decorre da produção seqüencial de mediadores inflamatórios como os eicosanóides e citocinas, onde a PGE<sub>2</sub> e o TNF- $\alpha$  seriam os principais mediadores edematogênicos (MURAKAWA *et al.*, 2006). Desta forma, evidencia-se que os metabólitos do AA são mediadores envolvidos na resposta inflamatória induzida pelo TPA e que compostos capazes de inibir a cascata do AA se mostram ativos no modelo de edema de orelha induzido por este agente, como efetivamente demonstrado pelos corticóides, inibidores da PLA<sub>2</sub> e inibidores da COX e/ou LOX (GÁBOR, 2000).

Este trabalho demonstrou que os extratos hidroalcoólicos da *Garcinia gardneriana* produzidos a partir de diferentes partes da planta (cascas, sementes e folhas), quando aplicados por via tópica, foram eficazes em reduzir o edema de orelha promovido pela aplicação tópica de óleo de cróton. Entretanto, o extrato oriundo das folhas foi o que apresentou maior eficácia causando inibição do edema. Este efeito sugere que a *G. gardneriana* apresenta componentes capazes de inibir o edema provocado pela aplicação de óleo de cróton. Como todos os extratos foram eficazes, é provável que os compostos ativos devam estar presentes em todas as partes testadas da planta, mas principalmente nas folhas, uma vez que foi o extrato que se mostrou mais eficaz. Este resultado somado ao fato do extrato das folhas ser obtido com maior facilidade, não apresentando risco à sobrevivência da planta, e aos estudos fitoquímicos de sua constituição que permitiram o isolamento de compostos para estudos mais aprofundados, levou à escolha deste extrato para dar continuidade aos estudos.

Assim, o EHGG das folhas também foi testado quanto ao tempo de efeito. O extrato foi aplicado 180, 120 e 60 minutos antes e depois da indução do edema por óleo de cróton, além de aplicação imediatamente após o agente flogístico, sendo que neste

tempo obteve-se a inibição máxima do edema. Entretanto, o efeito inibitório do edema foi observado desde o tratamento 120 minutos antes, até 180 minutos depois do óleo de cróton. Isto indica que os compostos presentes no EHGG das folhas responsáveis por essa ação, permanecem ativos até 120 minutos após sua aplicação, e já possuem ação contra uma resposta inflamatória presente. Castardo (2007) mostrou resultado semelhante, onde o EHGG das folhas apresentou ação antiedematogênica desde o tratamento quatro horas antes, até duas horas depois da carragenina. Desta forma, chega-se a mesma conclusão desta autora, de que os tempos necessários à manifestação do efeito e a sua duração sugerem que um ou mais compostos presentes no extrato possivelmente atuam em vários níveis de transdução dos sinais dos mediadores inflamatórios e/ou contra diferentes mediadores, sendo que a combinação de ação pode promover a reversão do processo inflamatório. Assim, um novo medicamento antiinflamatório com vários alvos de ação pode ser mais eficaz e potente, apresentando menos efeitos colaterais. Muitas moléculas estão sendo desenvolvidas com esse objetivo, uma vez que esta é uma nova abordagem discutida mundialmente como opção para redução dos efeitos indesejáveis.

A formação do edema está entre os sinais iniciais da inflamação. O edema é causado pelo fluxo transvascular de fluido rico em proteínas do compartimento intravascular para dentro do interstício, como resultado da ação da histamina, bradicinina, leucotrienos, componentes do complemento, substância P e Fator de Ativação das Plaquetas (PAF). Estes fatores alteram de forma marcante as funções de barreira dos pequenos vasos e aumentam a permeabilidade de capilares e vênulas a água e proteínas. A inflamação aguda é caracterizada por vasodilatação, exsudação de fluido rico em proteínas (plasma) e migração celular (primariamente neutrófilos) para o local da lesão (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Assim, seguindo o aumento na permeabilidade vascular, há o infiltrado celular, principalmente de neutrófilos (na fase aguda), que contribui para a resposta inflamatória através da produção, dentre outros mediadores, de radicais livres derivados do oxigênio, como o ânion superóxido e radicais hidroxilas (POSADAS *et al.*, 2004). Portanto, outro fator importante para avaliação da resposta inflamatória é a migração de neutrófilos para o local da lesão (FAURSCHOU e BORREGAARD, 2003). Sendo assim, o modelo de edema de orelha

induzido pelo TPA torna-se eficaz, já que também permite avaliar a infiltração leucocitária no tecido lesado durante uma resposta inflamatória aguda (WINYARD, 2003; GÁBOR, 2000). A aplicação tópica do TPA resulta no aumento gradual dos níveis da enzima MPO, de forma que a avaliação da atividade desta enzima é utilizada como indicativo da presença de leucócitos PMN no tecido inflamado, pois estudos demonstraram uma forte correlação entre atividade da MPO e número de neutrófilos no tecido (BRADLEY *et al.*, 1982).

A enzima MPO é encontrada primariamente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, sendo liberada após a ativação destes, dentro do fagossomo ou no espaço extracelular. Uma vez liberada, a MPO reage com o peróxido de hidrogênio formado pela NADPH oxidase e aumenta o potencial tóxico deste oxidante. O sistema hidroperóxido-MPO também promove a oxidação do cloreto, tirosina e nitrito, induzindo a formação de ácido hipocloroso, outros derivados do cloro, radicais tirosina e intermediários reativos de nitrogênio, enfim, compostos que podem atacar a superfície das membranas dos microorganismos (FAURSCHOU e BORREGAARD, 2003). Deste modo, a inibição da MPO é mais um indicador convincente de atividade antiinflamatória de um composto (BRADLEY *et al.*, 1982; FAURSCHOU e BORREGAARD, 2003). Acrescentando, Sanchez e Moreno (1999), colocam que compostos que inibem o influxo de leucócitos no tecido também suprimem a formação do edema e promovem a redução dos níveis de eicosanóides na área inflamada.

O EHGG das folhas, bem como os biflavonóides fukugetin e GB-2a, foram capazes de reduzir a atividade da MPO em mais de 50%, o que mostra que o extrato é capaz de reduzir o influxo leucocitário, o que pode estar colaborando para sua ação sobre a formação do edema. A inibição da atividade da MPO promovida pela administração de um composto pode ser decorrente da redução do recrutamento de neutrófilos no tecido inflamado, da inibição direta desta enzima ou ainda da redução da disponibilidade de seu substrato ( $H_2O_2$ ) (ARNHOLD, 2003). Estudo realizado por Castardo e colaboradores (2008) mostrou que o EHGG das folhas não inibiu de forma direta a atividade enzimática, quando incubado com a enzima. Esse dado sugere que a diminuição da atividade da MPO após tratamento com extrato das folhas *in vivo* se deve ao efeito do extrato sobre a migração de neutrófilos.

Neste estudo, a análise histológica de amostras das orelhas após 24 horas da indução do edema evidenciou que o tratamento com EHGG das folhas diminuiu, de maneira marcante, o infiltrado celular, o que confirma claramente os resultados obtidos com as medidas da atividade da MPO. O aumento do número de neutrófilos na pele tem grande relação com algumas doenças inflamatórias cutâneas como algumas dermatites e psoríase (RANG *et al.*, 2007; SCHAERLI *et al.*, 2004). Desta forma, os resultados obtidos dão suporte à hipótese da ação antiinflamatória da *Garcinia gardneriana*, uma vez que o extrato se mostrou capaz de atuar efetivamente sobre dois eventos importantes associados ao processo inflamatório: o edema e a infiltração de PMN.

Castardo *et al.* (2008) mostraram que o tratamento sistêmico com o EHGG das folhas foi capaz de reduzir a formação de edema de pata causado por diferentes agentes inflamatórios, como carragenina, histamina, substância P, bradicinina, composto 48/80, PGE<sub>2</sub> e TPA. Além disso, o EHGG das folhas e os biflavonóides testados, fukugetin e GB-2a, também reduziram o infiltrado celular. Os autores concluem que parte dos efeitos antiinflamatórios do EHGG pode ser atribuída aos biflavonóides fukugetin e GB-2a, entretanto, é provável que outros compostos devam estar colaborando para este efeito, sugerindo uma ação sinérgica entre os vários compostos presentes nas folhas da *Garcinia gardneriana* (CASTARDO *et al.*, 2008).

Flavonóides são uma ampla classe de substâncias naturais que se encontram em fontes de origem vegetal. Mais de 4.000 variedades de flavonóides foram identificadas. A sua capacidade antioxidante confere um potencial terapêutico para doenças cardiovasculares, úlceras gástricas ou duodenais, cancro ou patologias hepáticas. Igualmente importantes são os seus efeitos antivirais e antialérgicos, bem como sua ação antitrombótica e as propriedades antiinflamatórias (GONZÁLEZ-GALLEGO *et al.*, 2007). Tem sido demonstrado que os flavonóides são capazes de inibir a expressão da NOS, das ciclooxigenases e lipoxigenases, sendo estes responsáveis diretos pela produção de uma grande quantidade de óxido nítrico, prostanóides e leucotrienos, além de indiretamente auxiliarem na produção de outros mediadores do processo inflamatório, como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Assim, os dados disponíveis tornam evidente o potencial dos flavonóides

como novos agentes para o tratamento de possíveis doenças inflamatórias (GONZÁLEZ-GALLEGO *et al.*, 2007; TUÑÓN *et al.*, 2009).

A literatura mostra que as plantas do gênero *Garcinia* são ricas em biflavonoides e flavonóides, entre outros compostos (DELLE MONACHE *et al.*, 1983, 1984). Neste contexto, as folhas da *G. gardneriana* também são usadas para tratar inflamação, dor e infecções (BITTAR *et al.*, 2000). O extrato das folhas da *Garcinia gardneriana* e os biflavonóides isolados, fukugetin e GB-2a, apresentaram ação antiinflamatória frente ao edema de pata induzido pela aplicação intraplantar de carragenina (CASTARDO *et al.*, 2008). O fukugetin também apresentou ação antiedematogênica sobre o mesmo modelo e bloqueou a resposta anafilática induzida pela administração endovenosa de ovoalbumina (DA SILVA e GUIMARÃES, 1997). Além disso, Gil e colaboradores (1997) descreveram algumas atividades importantes para o fukugetin: atividade bloqueadora *in vitro* sobre a PLA<sub>2</sub> secretória, antiedematogênica sobre o edema de pata por carragenina e sobre o edema de orelha por TPA, onde também reduziu a atividade da MPO, sem interferir com a síntese de eicosanóides. O fukugetin é capaz ainda de inibir a peroxidação lipídica *in vitro* e agir como seqüestrador de ânions superóxido (SANZ *et al.*, 1994). Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio podem lesionar moléculas protéicas, mitocôndrias e DNA, levando a morte celular. Esses radicais também modulam atividades celulares e mediadores, o que leva à amplificação do sinal inflamatório (DYKE e SERHAN, 2003; PACHER *et al.*, 2007). O efeito antiinflamatório do EHGG pode ser atribuído aos biflavonóides, em maior extensão ao GB-2a (CASTARDO *et al.*, 2008).

A principal propriedade atribuída aos flavonóides é a atividade antioxidante, sendo esta decorrente da capacidade desses compostos atuarem como seqüestradores de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (SADIK *et al.*, 2003). A pele está cronicamente exposta a ERO oriundas tanto do ambiente como de fontes endógenas, além da superprodução de certas ERO e citocinas que podem desencadear graves problemas neste tecido (PORTUGAL *et al.*, 2007). Poluição do ar, radiação UV, microorganismos, viroses e xenobióticos podem servir como fontes exógenas de ERO, enquanto ERO endógenas são geradas durante o metabolismo celular normal, reações imunes e diversas condições patológicas (TROUBA *et al.*,



2002), como condições pós isquemia, onde a reperfusão leva a produção maciça de radical superóxido (MACCORD, 1985). As ERO também podem ser induzidas por citocinas, fatores de crescimento e outros estímulos fisiológicos (FUCHS *et al.*, 2001; KOHEN e NYSKA, 2002).

A superprodução ou remoção inadequada de ERO pode resultar em estresse oxidativo, levando a metabolismo alterado, sinal de transdução desregulado e alterações patológicas nas funções celulares e teciduais. O dano biológico que ocorre como resultado de níveis elevados de ERO é manifestado como peroxidação lipídica, mutação no DNA e oxidação/degradação protéica (KOHEN e NYSKA, 2002). O estresse oxidativo contribui para surgimento de efeitos adversos na pele, expressos como eritema, edema, rugas, fotoenvelhecimento, inflamação, manifestação autoimune, hipersensibilidade, anormalidades na queratinização, lesões e câncer de pele (NACHBAR e KORTING, 1995).

Os níveis de ERO estão consideravelmente aumentados nas doenças inflamatórias, o que contribui para o dano tecidual e a exacerbação do processo inflamatório (PÉREZ-GARCIA, 1996). Nesse contexto, teve-se por objetivo a avaliação da atividade antioxidante do EHGG das folhas através da determinação indireta da formação de ERO, onde foi demonstrada pela primeira vez a atividade antioxidante do EHGG e confirmou a atividade antioxidante dos compostos isolados fukugetin e GB-2a.

Em condições normais, o organismo está equipado por mecanismos eficientes de defesa contra estresse oxidativo, principalmente baseado em antioxidantes. Estes compostos possuem um amplo espectro de atividades para uma variedade de ERO e podem agir por muitos mecanismos diferentes (KOHEN *et al.*, 2000). Assim, o EHGG das folhas e os biflavonóides podem estar reduzindo os níveis teciduais de ERO por atuarem diretamente como seqüestradores de radicais livres, estimulando a ação dos sistemas de defesa contra ERO ou reduzindo a infiltração leucocitária, uma vez que segundo Nakamura *et al.* (2003), os neutrófilos quando ativados são responsáveis por uma produção bastante intensa destas espécies reativas. Para melhor esclarecer esta hipótese foi realizado teste *in vitro* da atividade seqüestradora de radicais livres do EHGG das folhas, bem como dos biflavonóides, fukugetin e GB-2a. Todos promoveram redução do radical livre DPPH *in vitro* de maneira concentração-dependente. O EHGG e

o GB-2a mostraram atividade seqüestradora de radicais livres, enquanto o fukugetin apresentou-se mais potente. Portanto, possivelmente parte do efeito redutor de ERO do EHGG esteja diretamente relacionada à capacidade de agir como seqüestrador de radicais livres, sendo que os biflavonoides testados devem estar participando deste efeito.

Para auxiliar na investigação sobre o mecanismo pelo qual a *G. gardneriana* promove seu efeito antiinflamatório, foram utilizados outros agentes flogísticos que desencadeiam processos inflamatórios agudos por mecanismos distintos, como o ácido araquidônico, fenol e capsaicina. Parte do efeito antiinflamatório do extrato das folhas da *G. gardneriana* poderia estar relacionada à inibição da síntese de metabólitos do ácido araquidônico ou bloqueio de suas ações. Isto porque, dados da literatura sugerem que compostos como corticóides, inibidores da COX ou 5-LOX e antagonistas do LTB<sub>4</sub> também são ativos no modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de crôton (MURAKAWA *et al.*, 2006; CARLSON *et al.*, 1985).

O AA é liberado de fosfolipídeos ligados à membrana celular através da ação das enzimas PLA<sub>2</sub> e PLC. Estas fosfolipases são conhecidas por serem ativadas por agentes promotores de tumor na pele, como o éster de forbol, TPA e raios ultravioleta B (UVB) (BOWDEN, 2004). Através da ação dessas fosfolipases, o AA é convertido em PGG<sub>2</sub> e, posteriormente, em PGH<sub>2</sub> por enzima COX (LAWRENCE *et al.*, 2002). A COX catalisa o primeiro passo na síntese de prostanóides, uma grande família de metabólitos do AA, incluindo PG e TX (KULKARNI e DHIR, 2009) e as LOX produzem os LT também a partir do AA (KUMAR *et al.*, 2005). As PG são mediadores autacóides que afetam praticamente todos os processos fisiológicos e patológicos através de sua interação reversível com receptores de membrana acoplados à proteína G (FITZPATRICK, 2004). Os LT, assim como as PG, têm ação vasodilatadora e edematogênica (ALLER *et al.*, 2006; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Os LT, em especial o LTB<sub>4</sub>, também ativam as respostas dos neutrófilos, como agregação e adesão ao endotélio venular, geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de enzimas lisossomais, além da potente atividade quimiotática (KUMAR *et al.*, 2005). O ácido araquidônico pode ainda atuar como um segundo mensageiro que regula muitos processos celulares, entre os quais a formação de NO (SIGNORELLO *et al.*, 2009).

O EHGG das folhas foi capaz de reduzir o edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico. Este resultado indica que o extrato pode interferir em parte na degradação do AA tanto pela COX como pela LOX. Antiinflamatórios não esteroidais (AINE) produzem os seus efeitos terapêuticos através da inibição da COX. Duas isoformas de cicloxigenase foram identificadas e são referidas como COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente e regula uma série de funções, tais como homeostasia vascular e gastroproteção, enquanto que COX-2 é induzível por mediadores, tais como fatores de crescimento, citocinas e endotoxinas, estando presente em locais de inflamação (KULKARNI *et al.*, 2000).

Outro modelo utilizado foi o da aplicação tópica de capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida). Esta, o principal ingrediente da pimenta vermelha do gênero *Capsicum*, é bem conhecida por promover respostas inflamatórias agudas neurogênicas, tais como vasodilatação, extravasamento de plasma, tosse e dor (HOLZER, 1991). Várias ações da capsaicina aparecem como resultado de estímulos seletivos de neurônios aferentes sensíveis à capsaicina que contém neuropeptídeos como neurotransmissores (HOLZER, 1988; MAGGI e MELI, 1988). Neuropeptídeos como a substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, peptídeo intestinal vasoativo e neuroquinina A (NKA) foram considerados os mediadores químicos da inflamação na pele neste modelo (HOLZER, 1988; 1991; MAGGI e MELI, 1988; SARIA *et al.*, 1988). Outros estudos têm mostrado que respostas inflamatórias, incluindo formação de edema, vasodilatação e alergia são provocadas em consequência à aplicação intradérmica de neuropeptídeos (WILLIAMS, 1982; DEVILLIER *et al.*, 1986; BRAIN e WILLIAMS, 1988). Além disso, neuropeptídeos têm sido encontrados no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (LARSSON *et al.*, 1989; MARSHALL *et al.*, 1990) e parecem desempenhar um papel central em doenças da pele, incluindo psoríase (FARBER *et al.*, 1986).

Foi relatado que a capsaicina pode induzir inflamação aguda na orelha (MANTIONE e RODRIGUEZ, 1990; GABOR e RAZGA, 1992) e na pata de ratos (DE GHOSH, 1990). Sua aplicação tópica na pele de ratos leva à excitação de neurônios aferentes (KENINS, 1982), aumento do fluxo sanguíneo na pele (JANCSO, 1968) e vasodilatação (LYNN *et al.*, 1992). Ratos tratados com capsaicina apresentaram orelhas

com eritema e edema, atingindo um efeito máximo aos 30 minutos da aplicação (IMOUE *et al.*, 1993). Estudos demonstram que o mecanismo de edema de orelha induzido pela aplicação de capsaicina é muito diferente daquele promovido pela aplicação de ácido araquidônico, uma vez que a formação de edema envolve neuropeptídeos, como a substância P e NKA, os quais também parecem desempenhar papel importante na liberação de histamina, que age como um mediador secundário no aumento da permeabilidade vascular em sítios inflamados. Assim, é provável que o edema induzido por capsaicina seja mediado por neuropeptídeos, através da ativação de nervos sensoriais na pele do rato, entretanto, outros peptídeos e outros mediadores podem estar envolvidos no desenvolvimento do edema neste modelo (INOUE *et al.*, 1993). Em nosso estudo, o EHGG das folhas não foi capaz de reverter o edema promovido pela aplicação tópica de capsaicina. Entretanto, Castardo *et al.* (2008) mostram que o EHGG das folhas sistêmico reduziu o edema de pata causado pela substância P, indicando que o extrato possivelmente interfere na atividade de neuropeptídeos. Contudo, nossos resultados mostram que por via tópica o EHGG não é capaz de interferir na atividade da capsaicina e de neuropeptídeos.

Para uma melhor caracterização das propriedades farmacológicas da *G. gardneriana* foi avaliado ainda o efeito do EHGG sobre o modelo de edema de orelha induzido pelo fenol, que mimetiza a dermatite de contato irritativa. Mediadores químicos importantes na irritação primária de contato, incluindo citocinas associadas a propriedades pró-inflamatórias, tais como IL-1  $\alpha$ , TNF-  $\alpha$  e IL-8, são produzidos por queratinócitos em resposta a estímulos exógenos, como o fenol (LIM *et al.*, 2004; WILMER *et al.*, 1994). Um dos mecanismos pelos quais o fenol promove esta ação seria a ruptura da membrana plasmática dos queratinócitos por efeito direto, resultando na liberação da IL-1 $\alpha$  pré-formada, além de outros mediadores inflamatórios como os metabólitos do AA e ERO. As citocinas pró-inflamatórias são induzidas nesse modelo por um mecanismo distinto daquele observado no modelo de inflamação cutânea induzido pelo TPA, através de vias dependentes da PKC, nas quais envolvem fatores de transcrição nuclear (WILMER *et al.*, 1994). Desta forma, ao intervir no edema provocado por este agente irritante, o EHGG das folhas mostrou que é capaz de intervir

na ação desencadeada pelo fenol e pode, assim, ser eficaz no tratamento de dermatite de contato irritativa.

Enfim, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o extrato da *Garcinia gardneriana* e seus biflavonóides testados apresentam atividade antiinflamatória tópica e antioxidante. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo de ação pelo qual essa planta exerce seus efeitos e para assegurar a inexistência de toxicidade, garantindo a segurança de seu uso tópico em humanos.

---

## CONCLUSÕES

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados observados no presente trabalho demonstraram que:

- O EHGG e biflavonóides, fukugetin e GB-2a apresentaram atividade antiedematogênica no modelo de inflamação cutânea aguda induzida pelo óleo de cróton, sugerindo que o EHGG possui mais de um composto responsável por tal atividade quando administrado topicamente;
- O EHGG, fukugetin e GB-2a inibiram a atividade da MPO no modelo de edema de orelha, indicando a presença de um ou mais compostos capazes de atuar sobre a migração leucocitária;
- O EHGG e os biflavonóides, fukugetin e GB-2a, foram capazes de reduzir a formação de ERO no modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, demonstrando uma possível ação antioxidante desse extrato que contribui para sua ação antiinflamatória;
- O EHGG e os biflavonóides, fukugetin e GB-2a, apresentaram excelente capacidade seqüestradora de radicais livres *in vitro*, o que contribui para sua ação redutora da produção de ERO e ação antiinflamatória;
- A formação do edema de orelha induzido pelo AA foi inibida pelo EHGG, indicando que o mecanismo de ação pelo qual o EHGG promove seu efeito anti-edematogênico possivelmente envolva a redução dos níveis dos metabólitos do AA no foco inflamatório;
- O EHGG não foi capaz de inibir o edema presente na inflamação neurogênica, conforme verificado no modelo de edema induzido pela capsaicina;
- O EHGG foi capaz de inibir a formação do edema durante a resposta inflamatória causada por um agente irritante (fenol), indicando uma possível eficácia no tratamento da dermatite de contato irritativa;

Em resumo, os resultados observados nos diferentes modelos de inflamação cutânea utilizados no presente trabalho, sugerem que o efeito antiinflamatório tópico do EHGG pode ser o resultado de um efeito sinérgico decorrente da ação dos biflavonoides testados (fukugetin e GB2a), além de outros compostos presentes principalmente nas folhas desta planta. Nesse contexto, o presente trabalho fornece

evidências científicas que validam o uso popular por via tópica da *G. gardneriana* no tratamento de processos inflamatórios cutâneos, bem como demonstra o potencial do extrato bruto desta planta para o desenvolvimento de um novo antiinflamatório para uso tópico.



---

## REFERÊNCIAS

## 7. REFERÊNCIAS

- AKATAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences**, v. 75, p. 639-653, 2004.
- ALLER, M.A.; ARIAS, J.L.; ARIAS, J.I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12 (10), p. 225 – 234, 2006.
- ARNHOLD, J. Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69 (1), p. 4-9, 2003.
- BASSO, L.A.; DA SILVA, L.H.; FETT-NETO, A.G.; DE AZEVEDO JR., W.F.; MOREIRA, I.S.; PALMA, M.S.; CALIXTO, J.B.; ASTOLFI FILHO, S.; DOS SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.; SANTOS, D.S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases . **A Review. Memory Institut Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 475-506, 2005.
- BECKER, P.F.L. Inflamação. In: **Patologia Geral**, Brasil: Sarvier, p.140-193, 1997.
- BITTAR, M; DE SOUZA, M. M.; YUNES, R. A.; LENTO, R.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Antinociceptive activity of I3,I18-binaringenin, a biflavonoid present in plants of the guttiferae. **Planta Médica**, v. 66, p. 84 – 86, 2000.
- BORRIS, R. P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 29-38, 1996.
- BOTTA, B.; MAC-QUHAE, M.; DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; DE MELLO, J. F. Chemical investigation of the genus *Rheedia*. V: Biflavonoids and xanthochymol. **Journal of Natural Products**, v. 47 (6), p. 1053, 1984.
- BOUCLIER, M.; CAVEY, D.; KAIL, N.; HENSBY, C. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacology Review**, v. 42, p. 127-154, 1990.
- BOWDEN, G.T. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 23-35, 2004.
- BRADLEY, P.P., PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, 206-209, 1982.
- BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J. Substance P regulates the vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide. **Nature**, v. 335, p. 73-75, 1988.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BRAZ FILHO, R.; CAVALCANTE DE MAGALHÃES, G.; GOTTLIEB, O. R. Xanthones of *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v. 9, p. 673,1970.

BRYAN, D.; WALKER, K.B.; FERGUNSON, M.; THORPE, R. Cytokine gene expression in a murine wound healing model. **Cytokine**, v. 31, p. 429-438, 2005.

BURBACH, G. J; ANSEL, J.C.; ARMSTRONG, C.A. Cytokines in the skin. In: **The Biology of the Skin**. 1 ed. The New York:Parthenon Publishing Group, p. 299-3319, 2000.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131 –134, 2005.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Médica**, v. 70, p. 93 – 103, 2004.

CARLSON, R.P.; O'NEILL-DAVIS, L.; CHANG, J.; LEWIS, A. Modulation of mouse ear oedema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v.17 (2), p. 197-206, p. 1985.

CASTARDO, J.C.; PRUDENTE, A.S.; FERREIRA, J.; GUIMARÃES, C.L.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V.; OTUKI, M.F.; CABRINI, D.A. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, 2008.

CASTARDO, J.C. **Avaliação da atividade do extrato hidroalcólico bruto da *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi em modelos experimentais de inflamação aguda em camundongos**. 2007. 137 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

CECHINEL FILHO, V.; DA SILVA, K. L.; DE SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, A. E.; YUNES, R. A.; GUIMARÃES, C. L.; VERDI, L. G.; SIMIONATTO, E. L.; DELLE MONACHE, F. I3-naringenina-II8-4'-OMe-eriodictyol: a new potential analgesic agent isolated from *Rheedia gardneriana* leaves. **Zeitschrift für Naturforsch**, v. 55c, p. 820-823, 2000.

CHUONG, C.M.; NICKOLOFF, B.J.; ELIAS, P.M., GOLDSMITH, L.A. MACHER, E. MADERSON, P.A. SUNDBERG, J.P.; TAGAMI, H.; PLONKA P.M.; HESTRUPPEDERSON, K.; BERNARD, B.A. SCHRODER, J.M.; DOTTO, P.; CHANG, C.M.; WILLIAMS, M.L.; FEINGOLD, K.R.; KING, L.E.; KLIGMAN, A.M., REES, J.L.; CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis da Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, IBDF, v. 6, p. 318-337, 1984.

CRUMMEY, A., HARPER, G.P., BOYLE, E.A., MANGAN, F.R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatoxy compounds. **Agents Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.

CRUZ, A. J.; LEMOS, V. S.; DOS SANTOS, M. H.; NAGEM, T. J.; CORTES, S. F. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta. **Phytomedicine**, v. 13, p. 442-445, 2006.

DA SILVA, S.; GUIMARÃES, C. L. Efeito analgésico de princípios ativos isolados do extrato bruto hidroalcoólico de *Rheedia gardneriana*. **Relatório apresentado ao programa de pesquisa PIBIC/CNPq**, Blumenau, 27 pp, 1997.

DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V.M; ARNICO-ROXAS, M. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. **Agents and Actions**, v. 42 (1-2), p.29-33, 1994.

DE YOUNG, L.M., KHEIFETS, J.B., BALLARON, S.J., YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, p.335-341, 1989.

DEBENEDICTS, C. JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M., GHOHESTANI, R.F. Immune functions of the skin. **Clinical Dermatology**, v.19, p. 573-585, 2001.

DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; BETTOLO, G. B. M. Chemical investigation of the genus *Rheedia*. II. Prenylated xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Journal of Natural Products**, v. 46 (5), p. 655 – 659, 1983.

DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; WATERMAN, P. G.; CRICHTON, E. G.; ALVES DE LIMA, R. Minor xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v. 23 (8), p. 1759-1759, 1984.

DEVILLIER, P., REGOLI, D., ASSERAF, A., DESCOURS, B., MARSAC, J.; RENOUX, M. Histamine release and local responses of rat and human skin to substance P and other mammalian tachykinins. **Pharmacology**, v. 32, p. 340-347, 1986.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G.P., CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69 – 91, 2002.

DYKE, T. E. V.; SERHAN, C. N. Resolution of Inflammation: A New Paradigm for the Pathogenesis of Periodontal Diseases. **Journal of Dental Research**, v. 82(2), p. 82 – 90, 2003.

ERDO, F.; TOROK, K.; ARANYI, P.; SZEKELY, J.I. A new assay for antiphlogistic activity: zymosan-induced mouse ear inflammation. **Agents Actions**, v. 39, p. 137-142, 1993.

FAERGEMANN, J. Atopic dermatitis and fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 545-563, 2002.

FARBER, E.M., NICKOLOFF, B.J., RECHT, B.; FRAKI, J.E. Stress, symmetry and psoriasis: possible role of neuropeptides. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 14, p. 305-311, 1986.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1317 – 1327, 2003.

FITZPATRICK, T.B. **Dermatology in General Medicine**. Rio de Janeiro: Revinter, ed. 5; v. I, p. 70-113, 2005.

FITZPATRICK, F.A. Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. **Current pharmaceutical design**, v. 10 (6), p. 577-588, 2004.

FOGH, K.; KRAGBALLE, K. Eicosanoids in inflammatory skin diseases. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 45, p. 6343-6354, 2000.

FREINKEIL, R.K.; WOODLEY, D.T. Introduction. FREINKEIL, R.K.; WOODLEY, D.T. In: **The Biology of the Skin**. 1 ed. New York :The Parthenon Publishing Group, p.15-17, 2000.

FUCHS, J.; ZOLLNER, T.M.; KAUFMANN, R.; PODDA, M. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, p. 337-353, 2001.

FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nature Review Genetics**. v.3, p.199-209, 2002.

FURSTENBERGER, G.; SORG, B.; MARKS, F. Tumor promotion by phorbol esters in skin: evidence for a memory effect. **Science**. v. 220, p. 89-91, 1983.

GÀBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p.129-131, 2003.

GÀBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2000.

GÀBOR, M., RAZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. **Agents Actions**, v. 36, p. 83-86, 1992.

GARCIA-PIÑERES, A.J.; CASTRO, V.; MORAES, G.; SCHMIDT, T. J.; STRUNCK, E.; PAHL, H.L.; MERFORT, I. Cysteine 38 in p65/NF-KB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 39713-39720, 2001.

GIL, B.; SANZ, M. J.; TERCENIO, M. C.; GUNASEGARAN, R.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, M. J. Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A2 with anti-inflammatory activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, p. 733 – 740, 1997.

GILROY, D. W., LAWRENCE, T., PERRETTI, M., ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 401-416, 2004.

GLASS, C.K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nature Reviews in Immunology**, v. 6, p. 44-55, 2006.

GONZALEZ-GALLENO, J., SANCHEZ-CAMPOS, S.; TUNON, M.J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. **Nutrición Hospitalaria**, v. 22 (3), p. 287-293, 2007.

GOODWIN, A.W. WHEAT, H.E. Sensory signals in neural populations underlying tactile perception and manipulation. **Annual Reviews in Neuroscience**, v. 27, p. 53-77, 2004.

GROS, L.; SAPARBAEV, M.; LAVAL, J. Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. **Oncogene**, v. 21, p. 8905-8925, 2002.

GUIMARÃES, C. L.; OTUKI, M. F.; BEIRITH, A.; CABRINI, D. A. Uma revisão sobre o potencial terapêutico da *Garcinia gardneriana* – NA. **Dynamis Revista Tecnológica**, v. 12 (48), p. 6-12, 2004.

GUSTAFSON, K. R.; MUNRO, M. H. G.; FULLER, R. W.; CARDELLINA, J. H. The Guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *G. ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, v. 48, p. 10093-10102, 1992.

HAAKE, A.; SCOTT, G.A.; HOLBROOK, K.A. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. FREINKEIL, R.K.; WOODLEY, D.T In: **The Biology of the Skin**. p.15-17, 1 ed. New York: The Parthenon Publishing Group, 2000.

HAYWOOD, R.; WARDMAN, P.; SANDERS, R.; LINGE, C. Sunscreens Inadequately Protect Against Ultraviolet-A-Induced Free Radicals in Skin: Implications for Skin Aging and Melanoma? **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, p. 862-868, 2003.

HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanism of action and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacological Review**, v. 43, p. 143-201, 1991.

HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v. 24, p. 739-768, 1988.

INOUE, H., NAGATA, N. KOSHIHARA, Y. Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: comparison with arachidonic acid-induced ear oedema. **British Journal of Pharmacology**. v.110, p. 1614-1620, 1993.

JANCSO, N. Desensitization with capsaicin and related acylamides as a tool for studying the function of pain receptors. In Pharmacology of Pain. ed. Lim, R.K.S., Armstrong, D. & Pardo, E.G. pp. 33-35. Oxford: Pergamon, 1968.

JUNG, K.; SEIFERT, M.; HERRLING, Th.; FUCHS, J. UV-generated free radicals (FR) in skin: Their prevention by sunscreens and their induction by self-tanning agents. **Spectrochimica Acta Part A**, 2007.

KABASHIMA, K.; MIYACHI, Y. Prostanoids in the cutaneous immune response. **Nature Immunology**, v. 5 (10), p. 1045-1051, 2004.

KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. **Dermatología Estética**. São Paulo: Atheneu, P. 3-8, 2004.

KENINS, P. Responses of single nerve fibers to capsaicin applied to the skin. **Neuroscience Lett.**, v. 29, p. 83-88, 1982.

KIM, H. K.; CHEON, B. S., KIM, Y. H.; KIM, S. Y.; KIM, H. P. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structural-activity relationships. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 759-765, 1999.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, p. 620-650, 2002.

KOHEN, R.; VELLAICHAMY, E.; HRBAC, J.; GATI, I.; TIROSH, O. Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues. **Free Radical & Biology Medicine**, v. 28, p. 871-879, 2000.

KOSTER, M.I. e ROOP, D.R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. **European Journal of Cellular Biology**, v.83, p. 625-629, 2004.

<sup>a</sup>KUPPER, T.S. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and Speculations. **Journal of Clinical Investigation**. v. 86, p. 1783-1789, 1990.

<sup>b</sup>KUPPER, T.S. The role of epidermal cytokines. In: SHEVACH, E. e OPPENHEIM, **Immunophysiology: The role of cells and cytokines in immunity and inflammation.**) New York:Oxford University Press, p. 285-305, 1990.

KULKARNI, S.K.; DHIR, A. Cyclooxygenase in epilepsy: from perception to application. **Drugs Today**, v. 45 (2), p. 135-154, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran. Patologia – Bases patológicas das doenças.** 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 49 – 79, 2005.

LARSSON, J., EKBLOM, A., HENRIKSSON, K., LUNDEBERG, T.; THEODORSSON, E. Immunoreactive tachykinins, calcitonin gene-related peptide and neuropeptide Y in human synovial fluid from inflamed knee joints. **Neuroscience Lett.**, v. 100, p. 326-330, 1989.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 787-795, 2002.

LEE, J.L.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D.R.; KOPELOVICH, L.; ATHAR, M. Cyclooxygenase in the skin: pharmacological and toxicological implications. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 192, p. 294-306, 2003.

LIANG, Y-C.; HUANG, Y-T.; TSAI, S-H.; SHIAU, S-Y.; CHEN, C-F.; LIN, J-K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. **Carcinogenesis**, v. 20, p.1945-1952, 1999.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid wogonin. **Archive Pharmacology Research**, v. 27, p. 442-448, 2004.

LLORET, S.; MORENO, J.J. Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, p. 347-353, 1995.

LUZZI, R.; GUIMARÃES, C. L.; VERDI, L. G.; SIMIONATTO, E. L.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; FLORIANI, A. E. O.; CECHINEL FILHO, V. Isolation of biflavonoids with analgesic activity from *Rheedia gardneriana* leaves. **Phytomedicine**, v. 4, p. 139 – 142, 1997.

LYNN, B., YE, W.; COTSELL, B. The actions of capsaicin applied topically to the skin of the rat on C-fiber afferents, antidromic vasodilation and substance P levels. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, p. 400-406, 1992.



- MACCORD, J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 159-163, 1985.
- MAGGI, C.A. ; MELI, A. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. **Genetic Pharmacology**. v. 19, p. 1-43, 1988.
- MANTIONE, C.R.; RODRIGUEZ, R. A bradykinin (BK), receptor antagonist blocks capsaicin-induced ear inflammation in mice. **British Journal Pharmacology**, v. 99, p. 516-518, 1990.
- MARKS, F.; FÜRSTENBERGER, G. The conversion stage of skin carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 11 (12), p. 2085-92, 1990.
- MARSHALL, K.W., CHIU, B., INMAN, R.D. Substance P and arthritis: analysis of plasma and synovial fluid levels. **Arthritis Rheumatics**, v. 33, p. 87-90, 1990.
- MENSOR, L.L. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapic Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.
- MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacology Reviews**, v. 52, p. 673-751, 2000.
- MUELLER, M. M. Inflammation in epithelial skin tumors: Old stories and new ideas. **European Journal of Cancer**, v. 42, p. 735-744, 2006.
- MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**. v.71, p. 1331-1336, 2006.
- NACHBAR, F.; KORTING, H.C. The role of vitamin E in normal and damaged skin. **Journal of Molecular Medicine**, v. 73, p. 7-17, 1995.
- NAKAMURA, Y.; KOZUKA, M.; NANIWA, K.; TAKABAYASHI, S.; TORIKAL, K.; HYASHI, R.; SATO, T.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T. Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: defferential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35 (9), p. 997-1007, 2003.
- NESTLE, F.O.; NICKOLOFF, B.J. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. **Journal of Clinical Investigation**, v. 13, p. 1664-1675, 2004.
- NICKOLOFF, B.J. e NESTLÉ, F.O. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. **Journal Clinical Investigation**, v.13, p. 1664-1675, 2004.

NOGUÉS, M.R.; GIRALT, M.; CERVELLÓ, I.; CASTILLO, D.D.; ESPESO, O.; ARGANY, N.; ALIAGA, A.; MALLOL, J. Parameters related to oxygen free radicals in human skin: a study comparing healthy epidermis and skin cancer tissue. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, p. 645-652, 2002.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiology Reviews**, v. 87, p. 315 – 424, 2007.

PASCUAL, G.; GLASS, C.K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, p. 321-328, 2006.

PÉREZ-GARCIA, F.; MARIN, E.; CANIGUERAL, S.; ADZET, T. Anti-inflammatory action of *Pluchea sagittalis*: involvement of an antioxidant mechanism. **Life Sciences**, v.59 (24), p. 2033-2040, 1996.

PHILLIPSON, J.D. New drugs from nature-it could be yew. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 2-8, 1999.

POBER, J.S.; SESSA, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 803-815, 2007.

PORTUGAL, M.; BARAK, V.; GINSBURG, I.; KOHEN, R. Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: present status and future considerations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, p. 412-422, 2007.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 331 – 338, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M.M; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**. Rio de Janeiro:Elsevier, 6 ed., 2007.

RASO, G. M.; MELI, R.; DI CARLO, G.; PACILLIO, M.; DI CARLO, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Science**, v. 68, p. 921-931, 2001.

RECIO, M.C.; GINER, R.M.; URIBURU, L.; MÁÑEZ, S., CERDÁ, M., DE LA FUENTE, J.R., RÍOS, J.L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Science**, v. 66, p. 2509-2518, 2000.

ROBSON, N. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). **Trigynobrathys**, p. 1 – 151, 1990.

ROBERT, C. e KUPPER, T.S. Inflammatory skin diseases, Tcells and immune surveillance. **New England Journal Medicine**, v. 341, p. 1817-1828, 1999.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; KAPLAN, M. A.; STOECKLI-EVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTMANN, K. An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1381 – 1385, 1994.

RODRIGUES, C. A.; OLIVEIRA, A. E.; WILLAIN, F. R.; CECHINEL FILHO, C. L.; GUIMARÃES, C. L.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F. Separation of biflavonoids from *Rheedia gardneriana* using chitin-Fe complex as stationary phase. **Pharmazie**, v. 55 (9), p. 699-700, 2000.

ROSS, M.H.; REITH, E.J.; ROMRELL, L.J. **Histologia: Texto e Atlas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Ed. Médica Panamericana, p. 347, 1993.

RYAN, T. The ageing of the blood supply and the lymphatic drainage of the skin. **The International Research and Review Journal for Microscopy**, v. 35, p. 161-171, 2004.

SADIK, C. D.; SIES, H.; SCHEWE, T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. **Biochemical Pharmacology**, v.65, p. 773-781, 2003.

SAMPAIO, S. A.P; CASTRO, R.M.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia Básica**, 2 ed. São Paulo:Artes médicas, p. 1-5, , 2000.

SANCHEZ, T.; MORENO, J.J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 877-879, 1999.

SANZ, M. J.; FERRANDIZ, M. L.; CEJUDO, M.; TERCENIO, M. C.; GIL, B.; BUSTOS, G.; UBEDA, A.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M. J. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. **Xenobiotica**, v.24 (7), p. 689 – 699, 1994.

SARIA, A., MARTLING, C.-R., YAN, Z., THEODORSSON-NORHEIM, E., GAMSE, R.; LUNDBERG, J.M. Release of multiple tachykinins from capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung by bradykinin, histamine, dimethylphenyl piperazinium, and vagal nerve stimulation. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 137, p. 1330-1335, 1988.

SARTI, S. J.; CARVALHO, J. C. Fitoterapia e fitoterápicos. In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, p. 13-38, 2004.

SEGRE, J.A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **Journal of Clinical Investigation**. v.116 (5), p. 1150-1158, 2006.

SERHAN, N.C. e SAVIL, J. Resolution of Inflammation: The beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6 (12), p.1191-1197, 2005.

SERHAN, N.C.; CHIANG, N.; DYKE, T.E.V. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 349-361, 2008.

SHAEFER, H. e REDELMEIER, T. E. **Skin Barrier: Principles of Percutaneous Absorption**. Switzerland :Karger, p. 1-3, 1996.

SCHAERLI, P.; BRITSCHGI, M. KELLER, M.; STEINER, U.C.; STEINMANN, L.S.; MOSER, B. PICHLER, W.J. Characterization of human T cells that regulate neutrophilic skin inflammation. **Journal of Immunology**. v. 173, p. 2151-2158, 2004.

SHERWOOD, E.R e TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anesthesiology**. v. 18 (3), p. 385-405, 2004.

SIGNORELLO, M.G.; SEGANTIN, A.; LEONCINI, G. The arachidonic acid effect on platelet nitric oxide level. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 14, 2009.

SILVA, C.S. e CARVALHO, J.C.T. Inflamação. CARVALHO, J.C.T. In: **Fitoterápicos antiinflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo:Tecmedd, 2004.

SIMMONS, D.L. What makes a good anti-inflammatory drug target? **Drug Discovery Today**, v.11(5/6), p. 210-219, 2006.

SOLIMAN, K.F.; MAZZIO, E. A., In vitro attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. **Proc. Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 218, p. 390-397, 1998.

SONG, H.Y.; LEE, J.A.; JU, S.M.; YOO, K.Y.; WON, M.H.; KWON, H.J.; EUM, W.S.; JANG, S.H.; CHOI, S.Y.; PARK, J. Topical transduction of superoxide dismutase mediated by HIV-1 Tat protein transduction domain ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced inflammation in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 75 (6), p. 1348-1357, 2008.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v. 67, p. 477-502, 2000.

SUFFREDINI, I. B.; PACIENCIA, M. L.; NEPOMUCENO, D. C.; YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts - Clusiaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 287 –290, 2006.

TROUBA, K.J.; HAMADEH, H.K.; AMIN, R.P.; GERMOLEC, D.R. Oxidative stress and its role in skin disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 4, p. 665-673, 2002.

TUNON, M.J.; GARCIA-MEDIAVILLA, M.V.; SANCHEZ-CAMPOS, V.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Potential of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: Modulation of Pro-

Inflammatory Gene Expression and Signal Transduction Pathways. **Bentham Science**, v. 10 (3), p. 256-271, 2009.

UCHI, H.; TERAOKA, H.; KOGA, T.; FURUE, M. Cytokines and chemokines in the epidermis. **Journal of Dermatological Science**, v. 24 (1), p. 29-38, 2000.

VANE, J.R. e BOTTING, R.M. Mechanism of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **American Journal of Medicine**, v. 104 (3A), p. 2S-8S, 1998.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, p. 253-262, 2000.

VERPOORTE, R., MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite production in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 181-187, 2002.

VERDI, L. G.; PIZZOLATTI, M. G.; MONTANHER, A. B. P.; BRIGHENTE, I. M. C.; JÚNIOR, A. S.; SMÂNIA, E. F. A.; SIMIONATTO, E. L.; DELLE MONACHE, F. Antibacterial and brine shrimp lethality tests of biflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 360-363, 2004.

WANG, B.; FUJISAWA, H.; ZHUANG, L.; FREED, I.; HOWELL, B.G.; SHAHID, S., SHIVJI, G.M.; MAK, T. W.; SAUDER, D.N. CD4 + Th1 and CD8 + type 1 cytotoxic T-cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 6783-6790, 2000.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tradicional Medicine Strategy 2002-2005**. Geneva, 2002.

WILLIAMS, T.J. Vasoactive intestinal polypeptide is more potent than prostaglandin E2 as a vasodilator and oedema potentiator in rabbit skin. **British Journal Pharmacology**, v. 77, p. 505-509, 1982.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life Science**, v. 58(18), p. 1485-507, 1996.

WILMER, J.L.; BURLESON, F.G.; KAYAMA, F.; KAUNO, J.; LUSTER, M.I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical – induced inflammation in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102 (6), p. 915-922, 1994.

WINYARD, P.G. Key stages in the acute inflammatory response and their relevance as therapeutic targets. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p.3-4, 2003.

YOUNG, J.M., SPIRES, D.A., BEDORD, C.J., WAGNER, B., BALLRON, S.J., DE YOUNG, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid.

**Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, p. 367- 371, 1984.

YOUNG, J.M.; WAGNER, B.; SPIRES, D.A. Tachyphylaxis in 12-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid ear oedema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, p. 48-52, 1983.

ZEGARSKA, B.; LELINSKA, A.; TYRAKOWSKI, T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. **Pharmaceutical Reports**, v. 58, p. 13-21, 2006.